T H E S E

présentée

à la FACULTE DES SCIENCES

de l'UNIVERSITE DE PARIS XI

-:-:-:-:-:-

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

(BIOLOGIE)

par

SAAD S A G U E M

Sujet de la THESE : VOIES METABOLIQUES ET ACTIVATION D'UN CANCEROGENE CHIMIQUE : LE DIBENZO(a,e)FLUORANTHENE.

Soutenue le 24 Mars 1982, devant la Commission d'Examen

MM. B. ROSSIGNOL Président

P. DANSETTE

P.L. GROVER

J.M. LHOSTE

J. TONNELAT

F. ZAJDELA Examinateurs

T H E S E

présentée

à la FACULTE DES SCIENCES

de l'UNIVERSITE DE PARIS XI

-:-:-:-:-:-

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

(BIOLOGIE)

par

SAAD S A G U E M

Sujet de la THESE : VOIES METABOLIQUES ET ACTIVATION D'UN CANCEROGENE CHIMIQUE : LE DIBENZO(a,e)FLUORANTHENE.

Soutenue le 24 Mars 1982, devant la Commission d'Examen

MM. B. ROSSIGNOL Président

P. DANSETTE

P.L. GROVER

J.M. LHOSTE

J. TONNELAT

F. ZAJDELA Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été préparée à la Section de Biologie de l'Institut Curie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance respectueuse à Monsieur le Docteur R. LATARJET qui m'y a accueilli et qui m'a soutenu tout au long de sa réalisation, Monsieur le Docteur J.M. LHOSTE, actuel Directeur de la Section de Biologie, en a accepté la direction. Ses conseils, et ses encouragements dans certaines périodes difficiles, m'ont permis de mener cet ouvrage à son terme. Je lui en suis très reconnaissant.

Je tiens également à exprimer mes remerciements les plus sincères au District de Paris-Ile de France du Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (GEFLUC) dont le soutien financier m'a permis d'achever ce travail.

Je tiens à remercier les membres du Jury, chargés de juger ce travail :

- le Professeur B. ROSSIGNOL, qui a accepté avec intérêt d'apporter les critiques du biologiste et de présider le Jury.
- le Professeur J. TONNELAT, à qui je dois ma formation initiale de biophysicien et qui a suivi mes recherches depuis leur début en y apportant ses conseils précieux et ses encouragements.
- le Docteur P.L. GROVER, du Chester Beatty Research Institute de Londres, qui me fait l'honneur de juger ce travail.
- le Docteur P. DANSETTE, auquel je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance et d'amitié pour son intérêt continu, et pour ses inlassables discussions et conseils. C'est à l'intérêt passionné qu'il porte aux mécanismes de la cancérogénèse chimique qu'il doit d'assumer la lourde charge du rapport principal sur cette thèse.

Ce travail a été réalisé au sein d'une équipe. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ceux qui, quotidiennement, ont su l'orienter, le coordonner et y participer directement. Le Docteur F. ZAJDELA en a été l'initiateur. Le Docteur B. EKERT et Madame O. PERIN m'ont appris les méthodes d'étude du métabolisme "in vitro". Le Docteur B. MUEL m'a initié

aux méthodes de fluorescence et m'a accueilli dans son laboratoire pour la réalisation de la majeure partie de ce travail. Le Docteur J. MISPELTER m'a apporté son expérience et sa collaboration constante pour la réalisation des analyses par résonance magnétique nucléaire. Les Docteurs J.L. DIMICOLI et V. FAVAUDON m'ont apporté de fructueuses discussions des problèmes enzymatiques, le Docteur F. PERIN son aide et ses conseils continus. A tous, j'exprime ma gratitude et mon amitié.

Enfin, j'aurai une attention particulière à l'égard de Mademoiselle A. LERAY pour la qualité de la présentation de cette thèse, et de tous les personnels de l'Institut Curie pour l'aide et l'amitié qu'ils m'ont apportées en toutes circonstances.

SOMMAIRE

Chapitre I — **Introduction Générale** — Pages

I : La cancérogénèse chimique

A) Introduction 1

B) La nature des cancérogènes chimiques 2

C) Hydrocarbures aromatiques polycycliques 2

D) Activation métabolique des PAH cancérogènes (théorie de la région baie) 3

II : Enzymologie

A) Introduction 5

B) Le cytochrome P-450 6

C) Le NADPH-cytochrome P-450-réductase 7

D) Cycle catalytique 9

III : Techniques

A) Matériels 9

B) Techniques 10

1) Emission 10

2) Chromatographie 10

3) Résonance magnétique nucléaire 11

Chapitre II — **Métabolisme du dibenzo(a,e)fluoranthène (DBF)**

I : Généralités

A) Introduction 12

B) Prévisions théoriques 13

C) Techniques biophysiques 15

II : Métabolisme du DBF

A) Incubation microsomale du DBF et isolement des métabolites 18

B) Structure des métabolites formés 19

III : Métabolisme du 7-méthyl-DBF et du 7-hydroxy-DBF

A) Introduction 28

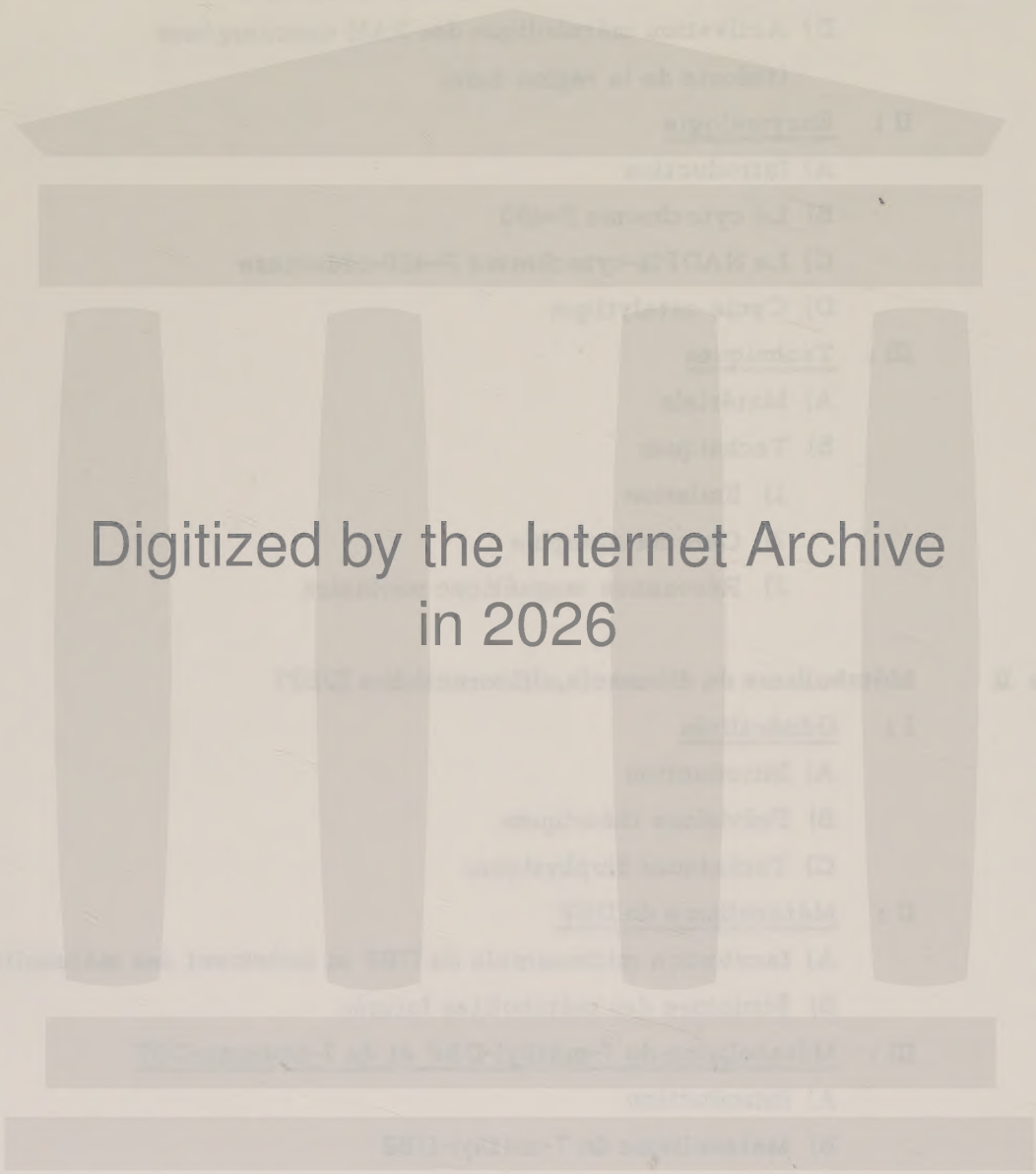
B) Métabolisme du 7-méthyl-DBF 29

C) Métabolisme du 7-hydroxy-DBF 29

Chapitre III — **Métabolisme secondaire du dibenzo(a,e)fluoranthène : époxydation vicinale des trans-EE-dihydrodiols**

I : Introduction 33

II : Prévisions théoriques et conditions opératoires 34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547311_0004

III : Métabolisme du 3,4-dihydrodiol 35
A) Métabolisme total 36
B) Structure des métabolites du 3,4-dihydrodiol 37
C) Particularités du métabolisme du 3,4-dihydrodiol 44
IV : Métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol 45
A) Conditions opératoires 45
B) Structure des métabolites 45
C) Particularités du métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol 49
V : Métabolisme du 12,13-dihydrodiol
A) Métabolisme total 51
B) Structures des métabolites 51
a) Propriétés spectrales de la fluorescence 51
b) Identification des structures par RMN 55
c) Origine métabolique du 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol 56
C) Particularités du métabolisme du 12,13-dihydrodiol 58

Chapitre IV **Etude métabolique comparative (rats-souris)**
I : Généralités
A) Introduction 60
B) Equipements enzymatiques
a) Chez la souris (induction 3-MC) 60
b) Chez le rat 62
II : Comparaison métabolique
A) Métabolisme du DBF 63
B) Métabolisme du 3,4-dihydrodiol 64
C) Métabolisme du 12,13-dihydrodiol 67
III : Conclusion 71

Chapitre V **Action du norharman sur le métabolisme du dibenzo(a,e)fluoranthène**
I : Inhibiteurs et activateurs des cytochromes P-450 74
II : Effets du norharman sur les voies métaboliques du DBF
A) Métabolisme du DBF 77
B) Métabolisme du 7-hydroxy-DBF 79
C) Métabolisme du 12,13-dihydrodiol 80
D) Métabolisme du 3,4-dihydrodiol 81
E) Métabolisme du 1,2,3,4-tétrol et du 10,11,12,13-tétrol 82
F) Cinétique de l'inhibition de la formation enzymatique du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol 82
III : Discussion

Chapitre VI **Modèle enzymatique et effets biologiques (formes métaboliques ultimes)**

I : Introduction 88

II : Modèle d'interaction : cytochrome P-450-DBF

A) Particularités des voies métaboliques du DBF 89

B) Voies métaboliques du DBF en présence de 0,9 mM de norharman 91

C) Modèle 92

III : Effets biologiques et formes métaboliques ultimes 95

Références 98

CHAPITRE I

Introduction Générale

I - LA CANCEROGENESE CHIMIQUE

A) Introduction

La cancérogénèse chimique connaît actuellement un regain d'actualité. Cela est dû sans doute à l'impulsion donnée à la lutte contre la pollution de notre environnement. En effet, des enquêtes, de mieux en mieux organisées et spécialisées, d'épidémiologie et de cancérologie géographique laissent penser qu'environ 80 % des cancers apparus chez l'homme seraient la conséquence de l'environnement par suite de la modification des qualités originelles de ses trois éléments, terre, air, eau (1,2,3,4). De ce fait, les multiples problèmes qu'engendre la pollution de notre environnement sont un sujet général de préoccupation, particulièrement dans les pays industrialisés.

L'association des substances chimiques avec le cancer remonte à plus de deux siècles. Hill avait signalé en 1761 une apparition fréquente de tumeurs humaines chez les sujets usant d'une manière excessive de la cigarette (5). La découverte la plus remarquable est cependant celle de Sir Percival Pott. Il avait montré en 1775 que la fréquence élevée des cancers du scrotum chez les jeunes ramoneurs était due à la présence dans la suie des cheminées de substances chimiques (6,7).

L'action cancérigène de substances présentes dans notre environnement fut ainsi démontrée pour la première fois. 3 ans plus tard, des mesures préventives ont été imposées aux ramoneurs danois pour éviter le contact prolongé avec la suie, consistant à se doucher quotidiennement. Ces surveillances ont permis de proposer des normes efficaces de prévention et les succès de ces mesures furent reconnus, un siècle plus tard, dans un rapport publié par Butlin (17).

Les observations faites en 1875 par Von Volkman, selon lesquelles la fréquence du cancer de la peau est très élevée chez les travailleurs chroniquement exposés aux goudrons de houille (18), avaient permis de confirmer le rôle joué par certaines substances chimiques dans la génèse des cancers. Toutefois, ce n'est qu'en 1915 que furent obtenues les premières tumeurs sur l'oreille de lapin, provoquées par un badigeonnage prolongé avec une solution de goudron (19). Ces résultats de Yamagiwa et Ichikawa ont permis à la cancérogénèse chimique de devenir une science expérimentale.

En 1930, l'induction d'un cancer de peau chez la souris a été réalisée pour la première fois par badigeonnage avec un hydrocarbure aromatique polycyclique pur extrait du goudron : le dibenzo(a,h)anthracène (20). Cook et coll. ont pu, 3 ans plus tard, isoler et identifier le benzo(a)pyrène comme étant la principale substance cancérogène dans le goudron de houille (21). Depuis lors, des centaines de produits chimiques ont été testés expérimentalement sur des animaux de laboratoire, ce qui a permis d'identifier un très grand nombre de substances cancérogènes.

B) La nature des cancérogènes chimiques

Les substances chimiques reconnues actuellement comme susceptibles de provoquer l'apparition et le développement d'un cancer sont extrêmement variées. Elles groupent des composés organiques naturels ou de synthèse, parmi lesquels se trouvent des agents alkylants (nitrosamines, nitrosamides ...), des aminés et amides aromatiques, des hydrocarbures polycycliques aromatiques, des dérivés halogènes, des alcaloïdes, des mycotoxines (23).

Signalons aussi que certains composés inorganiques ont une très grande réactivité chimique et sont impliquées dans la génèse de plusieurs cancers ; parmi ces produits, citons des dérivés métalliques et des complexes de silicates (22,23).

C) Hydrocarbures aromatiques polycycliques

La famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) contient de loin, le plus grand nombre de substances cancérogènes connues ; il s'agit de plusieurs centaines de corps chimiques extraits des goudrons divers ou obtenus par voie synthétique. En tant que composants de la suie, ils résultent de la combustion incomplète du charbon. Toutefois, leur principale source de formation est la polymérisation de radicaux libres obtenus au cours de la pyrrolyse de composants pétroliers (industrie, automobile...) (43).

Des centaines de composés appartenant à cette famille ont pu être testés et reconnus comme agents cancérogènes. Il s'agit pour la plupart de molécules de taille moyenne constituées par la fusion de 4 noyaux aromatiques au moins (benzo(a)pyrène, benz(a)anthracène, chrysène...).

Pour essayer de trouver des corrélations entre la structure électronique et le pouvoir cancérogène des hydrocarbures aromatiques polycycliques, les chimistes théoriciens ont pu définir des régions électroniques importantes : la région mésophénanthrénique ou région K riche en électrons et douée de la plus faible énergie d'ortholocalisation (exemples : liaisons 4-5 du benzo(a)pyrène et 5-6 du benz(a)anthracène) et la région L ou région mésoanthracénique qui représente les plus faibles valeurs de l'énergie de para-localisation (région 7-12 du

benz(a)anthracène : Fig. I.1.

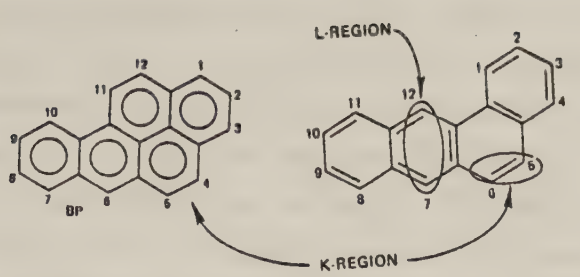


FIG. I-1. – Exemples de régions K et L

Des observations convergentes ont conduit à l'élaboration d'une théorie générale dite la théorie "électronique" ou de la région K (51,42). Celle-ci peut être énoncée simplement en disant que la cancérisation se produit quand la région K de l'hydrocarbure est suffisamment activée et qu'elle n'est pas concurrencée par une région L trop activée.

D) Activation métabolique des PAH cancérogènes (théorie de la région baie)

Avant de pouvoir agir sur les structures cellulaires et induire la cancérisation, ces composés chimiques doivent subir une "activation". Celle-ci n'est qu'une transformation métabolique capable de les rendre chimiquement réactifs. Ainsi, ces substances n'agissent pas telles quelles et ne sont pas directement impliquées dans la génèse de la cancérisation. Elles doivent être préalablement transformées par des enzymes spécialisées en des formes dites "ultimes" capables de réagir chimiquement avec les constituants cellulaires (44,45,46).

Durant les 15 dernières années, un grand nombre de travaux dans plusieurs laboratoires ont permis de clarifier le problème posé par l'activation métabolique des hydrocarbures aromatiques polycycliques, qui avait donné lieu pendant longtemps, à des interprétations contradictoires. Les travaux de Boyland (47) et de Gelboin (48) ont permis de montrer que les époxydes étaient des intermédiaires métaboliques formés lors de l'incubation des PAH en présence de microsomes hépatiques et de NADPH. Les époxydes de la région K avaient été

longtemps suspectés comme étant responsables du pouvoir cancérogène des PAH (49,50). A l'heure actuelle, la région K n'est plus considérée comme déterminante. En effet, les travaux effectuées par Baird et coll. (52), par Borgen et coll. (53) et surtout par Sims et Grover (54) ont montré que l'activation métabolique des PAH cancérogènes nécessite deux époxydations successives qui, en outre, ne font pas intervenir la région K. Le premier époxyde formé est hydrolysé en dihydrodiol qui subit ensuite une époxydation de la liaison éthylénique adjacente à la fonction dihydrodiol. Un grand nombre d'études sur le métabolisme du benzo(a)pyrène et sur les activités biologiques de ses métabolites ont permis d'identifier le 7β,8α-dihydroxy-9α,10α-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène comme forme "ultime" (76,77,78,79,80). Sur la Fig. I.2, sont illustrées les différentes étapes métaboliques aboutissant à l'activation du benzo(a)pyrène.

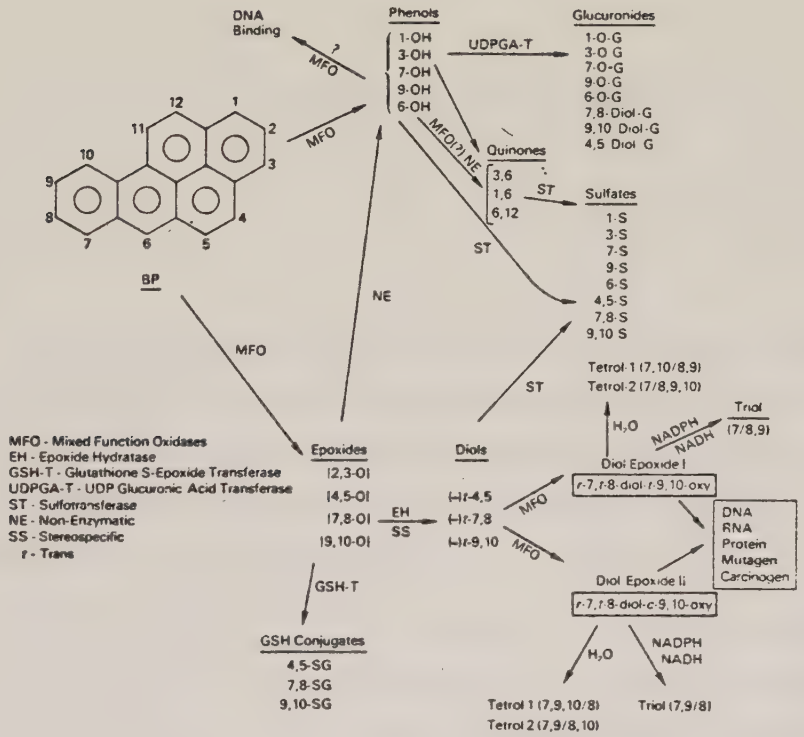


FIG. I-2. — Métabolisme et activation du benzo(a)pyrène

Ce résultat a été mis à profit par Jerina et coll. pour proposer une théorie permettant de généraliser ce mode d'activation métabolique à tous les hydrocarbures polycycliques cancérogènes possédant une région baie (60,79) (Fig. I.3).

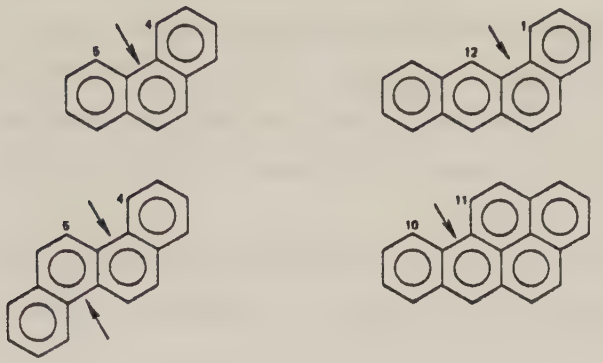


FIG. I-3. — Exemples de régions baies

Cette théorie fait intervenir les diols époxydes d'une telle région comme intermédiaires métaboliques potentiellement "ultimes". Selon cette théorie basée sur des calculs quantiques, ces diols époxydes aboutiraient facilement à la formation transitoire d'ions carboniums de type benzylique sur les cycles terminaux des hydrocarbures polycycliques possédant une région baie. Cette théorie est largement admise à l'heure actuelle.

Il est cependant possible que d'autres métabolites électrophiles puissent se former au cours de la métabolisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques et jouer un rôle dans la cancérogénèse chimique. Parmi ces métabolites, citons des radicaux libres (61), des esters (62,63) et des époxydes ne faisant pas intervenir la région baie (165,166).

II - ENZYMOLOGIE

A) Introduction

Une très grande variété de composés, aussi bien endogènes qu'exogènes, sont métabolisés dans la cellule par les oxydases à fonction mixte (MFO) du réticulum endoplasmique.

Parmi ces composés, figurent des acides gras, des stéroïdes et également des substances étrangères de natures très variées, dans lesquelles se trouvent des alkanes, des insecticides, des herbicides et des défoliants, des conservateurs et des additifs, des composés azotés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, de très nombreux médicaments...

Ces enzymes sont localisées principalement dans les cellules du parenchyme hépatique mais on les trouve également, à faible teneur, dans différents tissus tels que la peau, les lymphocytes, le placenta, les cellules des corticosurrénales, les cellules du corps jaune de l'ovaire, les cellules interstielles du testicule...

D'autres organites cellulaires que le réticulum endoplasmique ont des systèmes enzymatiques analogues ; c'est le cas notamment des mitochondries et du noyau.

Il s'agit de monooxygénases (ou hydroxylases) capables de réaliser l'insertion d'un seul atome d'une molécule d'oxygène dans un substrat. Le second atome d'oxygène est réduit en eau, ce qui nécessite l'intervention d'un donneur d'électrons (NADPH). La réaction globale est la suivante :

$$\text{Substrat - H} + H^+ + \text{NADPH} + O_2 \longrightarrow \text{Substrat - OH} + H_2O + \text{NADP}^+$$

Bien que l'hydroxylation dans la cellule hépatique de certains composés ait été attribuée à une flavoprotéine oxydase (85), la grande majorité des oxydations à fonctions mixtes est catalysée par des systèmes enzymatiques faisant intervenir, d'une part, une oxydase terminale sensible à l'oxyde de carbone, le cytochrome P-450 et, d'autre part, une flavoprotéine, la NADPH-cytochrome P-450 réductase, le donneur initial d'électrons de cette chaîne étant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Ce système n'est fonctionnel qu'en présence de lipides et de phospholipides.

B) Le cytochrome P-450

L'oxydase terminale de la chaîne de transport d'électrons est une hémoprotéine (65) capable de réagir directement avec l'oxygène moléculaire. C'est elle qui apporte la spécificité de la réaction enzymatique (66).

Plusieurs formes de cytochromes P-450 sont présentes dans la membrane du réticulum endoplasmique, possédant des poids moléculaires se situant entre 43 000 et 60 000 (100). Le nombre de ces isoenzymes ainsi que leur importance relative dépend de l'espèce animale, de l'âge, du sexe et du prétraitement chimique subi (68,69,70).

Contrairement à la plupart des enzymes, les cytochromes P-450 microsomaux des mammifères ne semblent pas manifester une étroite spécificité vis-à-vis de leurs substrats. Une forme donnée est capable d'agir sur plusieurs

composés avec toutefois une activité catalytique très variable d'une forme à l'autre (71,72). La seconde caractéristique récemment établie par plusieurs investigations, est que ces cytochromes P-450 catalysent des réactions portant sur des sites spécifiques du substrat (73,74).

Ce sont surtout, les microsomes hépatiques du lapin qui ont été les plus utilisés ces dernières années pour isoler et caractériser les différentes formes enzymatiques dénommées LM_n. Celles-ci diffèrent par leurs propriétés électrophorétiques, antigéniques et spectrales, par leur poids moléculaire et par leur spécificité vis-à-vis des substrats (75,76,77,78). Il existe une dizaine de cytochromes P-450 parmi lesquels se trouvent les deux principales formes LM_2 et LM_4 qui sont inductibles, respectivement, par le phénobarbital et par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (3-méthylcholanthrène, β-naphtoflavone...). Il semble que les enzymes inductibles soient impliquées essentiellement dans le métabolisme des substances exogènes, tandis que les formes constitutives joueraient un rôle plus important dans la métabolisation des composés biologiques (lipides, stéroïdes...) (67,68,123). Le site actif du cytochrome P-450 est constitué par un hème solidement attaché bien que de façon non covalente, au reste protéique de l'enzyme. Sous sa forme réduite et complexée à l'oxyde de carbone, cet hème présente un maximum d'absorption (la bande de Soret) à une longueur d'onde située aux alentours de 450 nm et très caractéristique de ces cytochromes.

Le mécanisme d'action des cytochromes P-450 a fait l'objet d'études intensives au cours des dix dernières années. Il est bien établi actuellement que ces réactions catalytiques utilisent successivement deux électrons fournis par NADPH (126). Le premier intervient en réduisant la forme ferrique du complexe enzyme-substrat, tandis que le transfert du second électron est précédé par la fixation de la molécule d'oxygène sur le site actif du cytochrome P-450 (124,125).

La réduction de l'hémoprotéine dans les microsomes hépatiques de rat est une réaction biphasique obéissant à des cinétiques du premier ordre (127,128) et ceci, indépendamment de la température, de la nature de l'induction subie par l'animal et de la présence ou de l'absence du substrat (128). Des résultats similaires ont été obtenus avec des systèmes enzymatiques reconstitués in vitro à l'aide des enzymes préalablement purifiés LM_2 ou LM_4 (129,130). Ainsi, la nature biphasique de cette réduction ne peut résulter de la multiplicité des cytochromes P-450 dans la membrane microsomale.

C) Le NADPH-cytochrome P-450-réductase

C'est une flavoprotéine qui intervient dans la réduction du cytochrome P-450. Elle est également capable de réduire le cytochrome c ainsi que le cytochrome b_5, en se substituant à la NADH-cytochrome b_5-réductase (131). Cette

enzyme présente les mêmes propriétés immunologiques et catalytiques lorsqu'elle provient de foie de rats induits ou non au phénobarbital ou au 3-méthylcholanthrène (132). Bien que deux formes de la réductase aient pu être séparées par électrophorèse à partir des microsomes hépatiques de rats ou de lapins, elles sont capables de catalyser la réduction de nombreux cytochromes P-450 avec des efficacités comparables (133). La concentration en réductase dans les microsomes hépatiques est généralement très faible devant celle en cytochrome P-450 (une molécule de flavoprotéine pour 20 à 70 molécules d'hémoprotéines).

Tenant compte de cette particularité, plusieurs auteurs ont suggéré un arrangement rigide du cytochrome P-450 et de la réductase dans les membranes microsomales selon lequel la flavoprotéine serait entourée par plusieurs molécules de cytochromes P-450 (134,135). Cependant, l'incorporation de l'une des deux enzymes préalablement purifiées dans les membranes microsomales aboutit à un couplage électronique et à une augmentation de l'activité catalytique (136,137) allant ainsi à l'encontre d'un modèle d'aggrégats.

En fait, des études cinétiques effectuées à partir des deux composantes enzymatiques purifiées et de phospholipides montrent que la formation d'un complexe binaire cytochrome P-450-réductase est indispensable à la catalyse (138). Ce complexe possède une constante de dissociation très faible, de l'ordre de 0,05 µM (138).

Ce type d'interaction, compte tenu de la très grande stabilité du complexe et la présence en quantités limitiées de la réductase dans les conditions physiologiques ont deux conséquences sur le processus catalytique :

- le transfert des électrons du NADPH jusqu'au cytochrome P-450 doit se faire avec un rendement maximal
- c'est la réductase et non l'hémoprotéine, qui constitue le facteur cinétiquement limitant de la réaction d'hydroxylation du substrat (16).

La NADPH-cytochrome P-450-réductase microsomale contient une molécule de FAD et une molécule de FMN (139,140). Elle diffère ainsi de celles présentes dans les mitochondries (141) et dans certaines bactéries (142) qui ne possèdent qu'un coenzyme flavinique (FAD). FMN intervient directement dans le transfert successif de deux électrons au cytochrome P-450, tandis que FAD est l'accepteur réduit en une étape biélectronique par NADPH (143).

Signalons enfin que des études récentes semblent montrer que la nature biphasique de la réduction des cytochromes P-450 pourrait résulter des propriétés catalytiques de la réductase (143).

D) Cycle catalytique

La première étape du cycle catalytique est la fixation du substrat RH sur le cytochrome P-450 (site 1 de la Fig. I.4) dans sa forme oxydée vraisemblablement pentacoordonnée. La première réduction par un électron aboutit à un complexe pentacoordonné ferreux capable de fixer certains ligands, tels que l'oxyde de carbone. Au cours du cycle catalytique, c'est la molécule d'oxygène qui se fixe sur le site pour conduire à un complexe hexacoordonné (oxycytochrome P-450). Il s'agit d'un complexe transitoire qui va être réduit par un deuxième électron pour conduire au complexe "oxygénatif" auquel on a attribué une structure d'oxène. La Fig. I.4, schématise les différentes étapes de ce cycle catalytique selon Estabrook et Werringhloer (144).

Les cytochromes P-450 sont aussi capables d'oxyder des substrats organiques en absence d'oxygène et de NADPH, mais en présence de péroxydes (145,146). Des péroxydes peuvent d'ailleurs se former au cours du cycle catalytique par autooxydation des cytochromes réduits en présence d'oxygène.

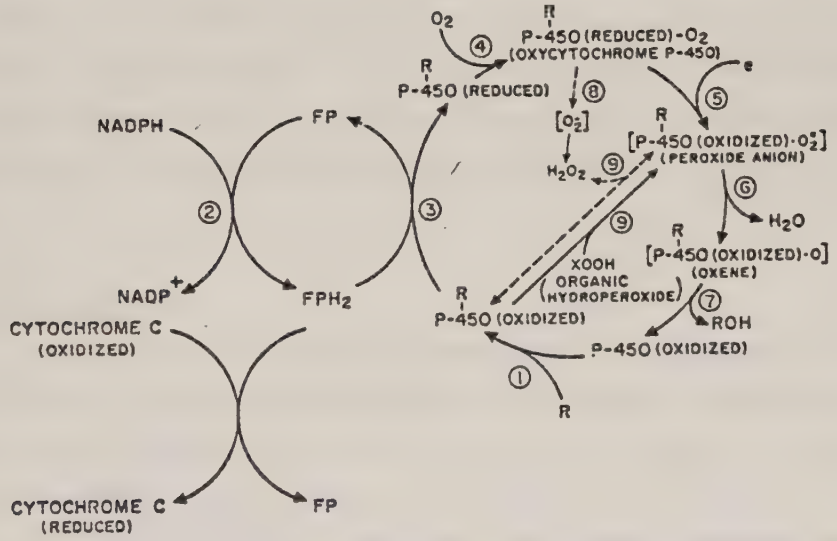


FIG. I-4. – Chaîne microsomale de transport d'électrons

III - TECHNIQUES

A) Matériels

Le dibenzo(a,e)fluoranthène a été préparé par O. Périn selon la méthode de Lavit-Lamy (35,36) et purifié sur colonne chromatographique (Kieselgel 60, 70 à 230 mesh ; Merck AG, Darmstadt, RFA) en utilisant comme solvant éluant un mélange de cyclohexane-benzène(8:2). Le benzo(a)fluoranthène (37) et le

10,11,12,13-tétrahydro-DBF (38) ont été synthétisés selon les techniques mentionnées dans les références 37 et 38.

Les microsomes ont été préparés à partir du foie de rat (Wistar) ou de souris (lignée XVII nc/Z) selon les méthodes décrites par Garner (39) et Ames (40). Les animaux ont été traités au 3-méthylcholanthrène (injection intrapéritonéale) 48 h avant d'être sacrifiés. La concentration en protéines des microsomes est déterminée par la méthode de Lowry (41). Les microsomes sont mis en suspension dans 0.05 M Tris-HCl : 0.25 M sucrose (pH 7.5) à une concentration en protéine de l'ordre de 10 mg par ml.

B) Techniques

1) Emission

Les spectres d'émission sont obtenus avec un spectrofluorimètre commercial Bearn Jobin et Yvon, muni d'un dispositif à miroir ellipsoidal de condensation de la lumière sur la fente d'entrée du monochromateur d'excitation. La lampe est une xenon de 150 watts. La détection photoélectrique comporte un photomultiplicateur utilisé entre 800 et 1000 volts, un microampèremètre et un enregistreur potentiométrique XY. Pour l'utilisation en luminescence à 77°K, l'azote liquide est contenu dans un vase Dewar en quartz et l'échantillon dans une coupelle en cuivre, qui est plongé dans l'azote liquide après avoir été préalablement congelé.

2) Chromatographie

Nous avons utilisé un chromatographe isocratique haute pression monté au laboratoire à partir de divers éléments commerciaux. L'intérêt de ce chromatographe est que la détection en densité optique est complétée par une détection en fluorescence avec longueur d'onde d'excitation et d'observation continument ajustables. Ce chromatographe comprend une pompe constametric IIG de chez LDC, un injecteur à boucle CV-6-UHPa-C20 de chez VALCO, un détecteur UV à deux longueurs d'ondes 254 et 280 nm simultanées, Duomonitor LDC et un spectrofluorimètre Bearn de chez Jobin et Yvon.

Une colonne de silice ODS 10 microns (Partisil 10 ODS de Whatman Reeve Angel) semi-préparative (M9) de 0,4 mm de Ø intérieur et de 50 cm de longueur a été utilisée.

Le méthanol est distillé sur une colonne de 2 m de haut. L'eau est bidistillée, la deuxième distillation ayant lieu dans un appareil de verre. Les solvants sont dégazés par ébullition permanente dans un ballon surmonté d'un réfrigérant.

3) Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique du proton sont obtenus en utilisant un spectromètre Varian XL-100 (Varian, Palo Alto, Calif. USA) par transformation de Fourier à 100 MHz. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au tétraméthylsilane ou indirectement par rapport au pic de solvant (acétone d6 à 2,06 ppm). Les composés sont dissout dans le minimum de solvant (300 µl) nécessaire à de bonnes performances dans un tube de 5 mm. Du fait de la présence de pics intenses provenant du solvant partiellement deutérié, de l'eau et d'impuretés aliphatiques, les spectres doivent être enregistrés par la méthode d'accumulation par bloc. Typiquement, environ 200 blocs de 100 impulsions avec un temps d'acquisition de 2 secondes et une largeur de bandes de 1000 Hz sont accumulés sur une nuit.

CHAPITRE II

Métabolisme du dibenzo(a,e)fluoranthène (DBF)

I - GENERALITES

A) Introduction

Le dibenzo(a,e)fluoranthène (DBF) dont la structure moléculaire est représentée sur la Figure II.1, appartient à la famille des benzo- et dibenzo-fluoranthènes qui sont des polluants très répandus de notre environnement. Son accroissement dans les milieux naturels ne cesse de se développer en raison de l'origine principale qui est constituée par la combustion incomplète de composés organiques utilisés à des fins industrielles et dans les moteurs à combustion (112). Ce sont sans doute les fumées urbaines qui contribuent principalement à l'accumulation du DBF dans l'hydrosphère (114,112) et à la surface des sols (112). D'autres milieux sont fortement suspectés de contenir cet hydrocarbure aromatique polycyclique. A titre d'exemple, nous évoquerons les cendres de cigarettes (115), les goudrons, ainsi que les aliments fumés (112).

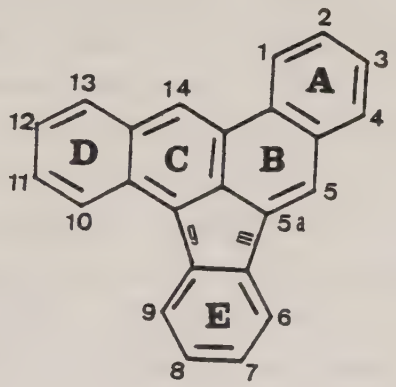


FIG. II-1 : Structure du DBF.

Le pouvoir cancérogène du DBF a été déterminé chez la souris dans des conditions classiques de tests de cancérogénicité, c'est-à-dire par injection sous-cutanée et par le test d'initiation-promotion sur la peau. Trois injections sous-cutanées à 1 mois d'intervalle dans le flanc droit de 0,6 mg de DBF dissout dans 0,2 ml d'huile végétale provoquent des sarcomes chez 100 % d'animaux (113). Dans l'expérience par badigeonnage, le DBF a montré un puissant pouvoir d'initiation

cancérogène. Une seule dose de 30 µg suivie de traitement de promotion provoque des épithéliomas chez 15 % d'animaux (F. Zajdela, observations non publiées.

Il est cependant important de signaler que le DBF diffère de la plupart des hydrocarbures aromatiques polycycliques ayant fait l'objet de recherches approfondies ces dernières années (benzo(a)pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène...) par les caractéristiques suivantes qui doivent être soulignées d'emblée. Il s'agit d'un composé polycyclique comportant un cycle pentagonal ; il appartient donc à la catégorie des hydrocarbures aromatiques dits non alternants. Il diffère aussi par l'absence, au sein de sa structure moléculaire, d'une région K. Enfin, le DBF se distingue des hydrocarbures déjà mentionnés par sa géométrie particulière. Cette moléculaire présente en effet trois ramifications aromatiques latérales qui se terminent chacune par un noyau benzénique (Fig. II.1). Tel n'est pas le cas, en revanche, des molécules de type benzo(a)pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène... qui n'en possèdent que deux. Outre la vraie région baie benzanthracénique située entre les carbones 1 et 14, le DBF présente, du fait de cette particularité géométrique, une zone délimitée par les carbones 9 et 10, qui peut être comparée à une region baie (Fig. II.1).

Ainsi le DBF offre une structure originale par rapport aux hydrocarbures aromatiques cancérogènes les plus étudiés ces dernières années. C'est l'une des raisons pour laquelle l'activation métabolique de ce composé hautement cancérogène méritait d'être étudiée. Nous avons étudié ce métabolisme du DBF, in vitro, par action de microsomes hépatiques de rats.

Ce chapitre sera consacré principalement à la détermination des structures des métabolites primaires du DBF. Une comparaison quantitative et qualitative entre le métabolisme du DBF et ceux de deux hydrocarbures non cancérogènes mais ayant la même structure aromatique que celle du DBF (7-méthyl-DBF et 7-hydroxy-DBF), sera aussi abordée.

Les deux sous-paragraphes suivants seront consacrés d'une part, à une étude théorique prévoyant l'évolution des voies métaboliques, et d'autre part, à une description rapide des techniques biophysiques que nécessitent l'isolement et l'identification des métabolites.

B) Prévisions théoriques

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I, les monooxygénases catalysent des réactions à la suite desquelles les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont convertis en époxydes (on admet actuellement l'existence d'autres activités enzymatiques qui aboutissent directement à la formation de phénols). Du fait de leur instabilité, ces époxydes ne sont qu'exceptionnellement détectables. Dans certains cas, ils subissent un réarrangement interne qui les

transforme en phénols. Le plus souvent ils sont hydrolysés en dihydrodiols. La réaction est catalysée par une enzyme microsomale, l'époxyde hydrolase. Ces derniers dérivent donc directement des époxydes et constituent un moyen indirect de les détecter.

Le DBF présente, au sein de sa structure, 9 liaisons qui sont potentiellement aptes à subir une époxydation enzymatique. Il s'agit des liaisons 1-2, 2-3, 3-4, 6-7, 7-8, 8-9, 10-11, 11-12 et 12-13 (nous admettons que la liaison 5-5a, qui correspond à une pseudo région K, est trop encombrée pour qu'elle subisse l'action enzymatique).

De ces 9 époxydations peuvent donc résulter 9 dihydrodiols. Ceux-ci appartiennent à deux groupes. Le premier est constitué par les molécules dans lesquelles les deux groupements hydroxyles ne sont pas encombrés et adoptent des conformations quasi- ou exclusivement équatoriales (trans-EE-dihydrodiols). Cela concerne les six dihydrodiols dont les groupements fonctionnels sont situés sur les liaisons 2-3, 3-4, 6-7, 7-8, 11-12 et 12-13. Par contre, la présence des deux régions baies au sein du DBF se traduit par des encombrements stériques au niveau des trois liaisons 1-2, 8-9 et 10-11, auxquelles correspondent donc des dihydrodiols dont les groupements hydroxyles adoptent des conformations quasi- ou exclusivement axiales (trans-AA-dihydrodiols).

La distribution électronique au sein d'un PAH n'est jamais uniforme. Il en résulte que toutes les liaisons n'ont pas forcément le même caractère aromatique. Dans ces conditions, la liaison intrinsèquement la plus réactive sous l'effet des monooxygénases devrait être celle qui possède le caractère éthylique le plus prononcé (116,117).

La Table II.1 illustre les résultats de ces calculs pour les 9 liaisons du DBF. Les indices de liaison, calculés par la méthode de Hückel, reflètent ce caractère éthylénique.

	1-2	2-3	3-4	6-7	7-8	8-9	10-11	11-12	12-13
DBF	0.692	0.626	0.703	0.675	0.645	0.678	0.722	0.599	0.727

TABLE II-1 : Indices de liaison du DBF

Les liaisons auxquelles sont associés les indices les plus élevés appartiennent toutes au noyau benzanthracénique de la molécule. Il s'agit des liaisons 1-2, 3-4, 10-11 et 12-13 qui peuvent donc être fortement suspectées d'être les sites privilégiés des époxydations enzymatiques, en dehors de toute considération

stérique.

En revanche, le noyau benzénique E et les deux liaisons 2-3 et 11-12 ne devraient pas manifester une forte réactivité chimique, dans la mesure où les cinq indices correspondant sont relativement faibles. Cependant, nous ne devons pas perdre de vue que ces prévisions théoriques découlent uniquement de la façon dont les électrons aromatiques sont répartis dans la molécule et que du point de vue enzymatique d'autres facteurs pourraient intervenir et modifier dans un sens ou dans un autre l'évolution métabolique du DBF.

C) Techniques biophysiques

L'identification des métabolites formés lors de l'incubation du DBF en présence des microsomes hépatiques, requiert l'isolement de ces métabolites par chromatographie et leur analyse par des méthodes physiques incluant la spectroscopie d'absorption et de fluorescence ainsi que la spectroscopie RMN.

a) Chromatographie

Afin d'obtenir une séparation efficace de ces dérivés, nous avons utilisé la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui est devenue une méthode standard à grand rendement parmi les méthodes analytiques modernes. En effet, celle-ci se distingue des techniques chromatographiques classiques par le fait qu'elle rend l'expérimentateur maître de la vitesse et la nature de l'éluant, qui sont deux facteurs dont dépend la résolution chromatographique. Nous avons utilisé une colonne chromatographique semi-préparative, dans laquelle la phase fixe est constituée par des groupes octadécyl (C_{18}), greffés à des particules de gel de 10 µm de diamètre (voir Chapitre I). Celle-ci assure d'excellentes performances dans l'HPLC pour la séparation des hydrocarbures aromatiques et de leurs dérivés. Avec une phase mobile constituée par un mélange eau-méthanol, le temps de rétention d'un composé est d'autant lus important que la polarité de celui-ci est faible. Selon ce critère, ce sont donc les métabolites du DBF ayant une structure de dihydrodiols qui vont apparaître les premiers sur le diagramme d'élution en tant que métabolites primaires. En revanche, le DBF non transformé qui est censé être le composé le plus hydrophobe et le moins polaire au sein de l'échantillon réactionnel, va présenter le temps de rétention le plus élevé. Entre les deux, vont s'éluer les composés de polarité intermédiaire, notamment des quinones et des phénols monosubstitués.

Une des caractéristiques des trans-AA-dihydrodiols, est de se comporter en phase inversée comme des métabolites nettement plus polaires que leurs homologues diéquatoriaux (118). Il résulte de cette propriété que les domaines

de migration de ces deux types de dihydrodiols, vont être nettement séparés. Outre le fait qu'ils ne peuvent être associés qu'aux liaisons 1-2, 8-9 et 10-11 du DBF, les trans-AA-dihydrodiols présentent cette particularité chromatographique qui les distingue de l'autre classe de dihydrodiols.

b) Spectroscopie

La plupart des hydrocarbures aromatiques ont un rendement de fluorescence élevé et des bandes d'émission assez fines, propriétés peu fréquentes si l'on considère l'ensemble des substances organiques qui, par contre absorbent toutes assez fortement dans le proche ultraviolet. De ce fait, la fluorescence permet une sélection plus facile des échantillons et est un meilleur critère d'identification que l'absorption. Nous avons choisi la luminescence à 77°K comme moyen de détection. Ceci permet d'une part, d'augmenter le rendement quantique en diminuant la désactivation thermique non radiative de l'état singulet et, d'autre part, d'affiner les bandes vibrationnelles.

La fluorescence des hydrocarbures aromatiques polycycliques est généralement associée aux électrons π. Ceux-ci peuvent interagir avec une radiation électromagnétique et passer de l'état fondamental à l'état excité caractérisé par une orbitale anti-liante π^*. La différence d'énergie entre les niveaux π et π^* sera caractéristique de la molécule. La destruction d'une double liaison diminue la délocalisation électronique au sein de la molécule aromatique, ce qui se traduit par une augmentation de l'énergie nécessaire pour faire passer la molécule de son état fondamental à son état excité. Ceci correspond à un déplacement hypsochrome, c'est-à-dire vers les courtes longueurs d'onde, de son spectre de fluorescence.

Cependant, cette règle ne doit s'appliquer qu'aux hydrocarbures aromatiques polycycliques dits alternants, au sein desquels les électrons se répartissent à peu près uniformément sur tous les atomes de carbones. Or, ce genre de distribution électronique n'est plus observé dans le cas des hydrocarbures non-alternants qui possèdent souvent un moment dipolaire ; ceci rend plus difficile dans certains cas, l'interprétation des déplacements spectraux observés. C'est ainsi que le benzo(a)fluoranthène (B(a)F), dont le système aromatique est analogue à celui d'un DBF ayant perdu la conjugaison du noyau A, présente un spectre de fluorescence déplacé vers les grandes longueurs d'onde (effet batochrome) par rapport à celui du DBF (Fig. II.2). Tel n'est pas le cas pour le 10, 11, 12, 13-tétrahydro-DBF qui présente un spectre accusant l'effet hypsochrome attendu par rapport à celui du DBF (Fig. II.3).

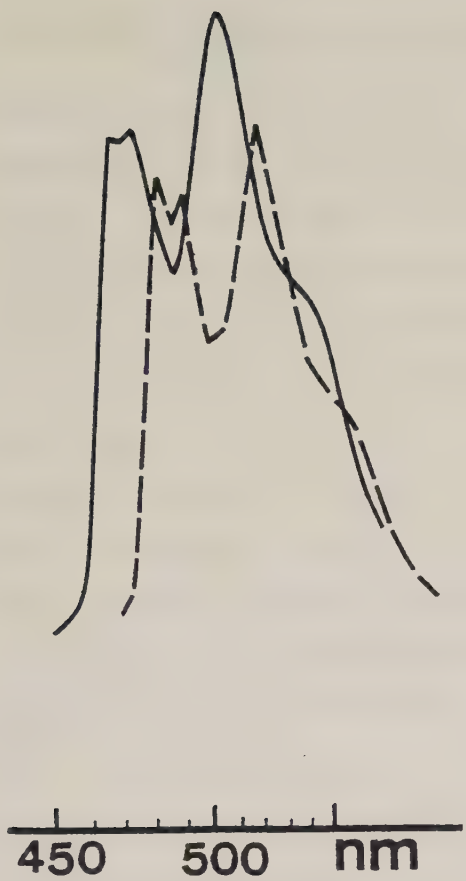


FIG. II-2 : Spectres de fluorescence non corrigés (77°K, éthanol absolu) du DBF (——) et du B(a)F (----)

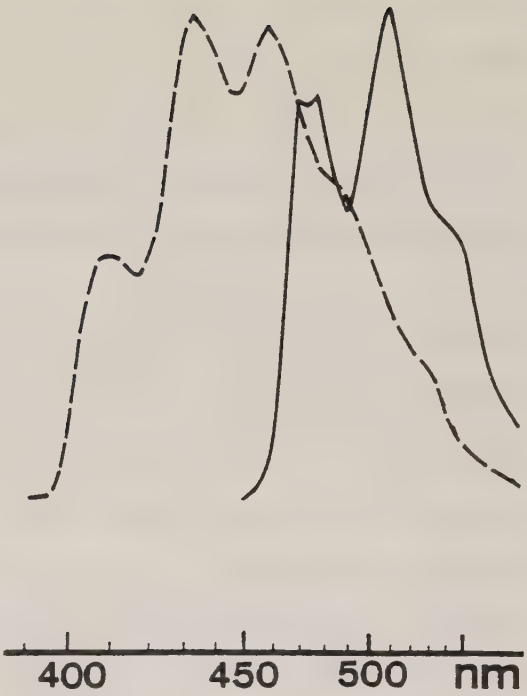


FIG. II-3 : Spectres de fluorescence non corrigés (77°K, éthanol absolu) du DBF (——) et du 10,11,12,13-tetrahydro-DBF.

Ainsi, nous devons nous attendre à ce que les métabolites résultant d'une destruction partielle ou totale de la conjugaison du noyau A, soient associés à des spectres de fluorescence déplacés anormalement vers les grandes longueurs d'onde, tandis que les métabolites du même type issus de l'attaque du noyau D, doivent présenter des spectres accusant un effet hypsochrome par rapport à celui de l'hydrocarbure intact.

II - METABOLISME DU DBF

A) Incubation microsomale du DBF et isolement des métabolites

L'expérience au cours de laquelle le DBF est soumis à l'action des monooxygénases s'effectue dans les conditions opératoires suivantes : 3 ml d'une suspension de microsomes hépatiques de rat induits au 3-méthylcholanthène (0,05 M Tris-HCl : 0,25 M sucrose pH 7,5 - 10 mg de protéines par ml) sont introduits dans 18,5 ml d'une solution aqueuse contenant 7,668 umoles de NADPH, 1,065 mmole de Tris-HCl pH 7,5 et 63,9 µmoles de $MgCl_2$. A la nouvelle suspension microsomale obtenu, sont ajoutés 150 µl d'acétone dans lesquels sont dissous 300 µg de DBF. Le mélange est ensuite incubé à 37°C durant 35 minutes. Les réactions enzymatiques sont arrêtées par l'addition de 15 ml d'acétate d'éthyle, volume qui permet une première extraction des métabolites formés et de l'hydrocarbure n'ayant pas réagi. Après une deuxième extraction utilisant le même volume d'acétate d'éthyle, la phase organique obtenue est alors évaporée à sec et sous vide. L'ensemble des métabolites et le DBF non transformé est repris par 0,85 ml d'un mélange de 0,7 ml de méthanol et de 0,15 ml d'eau et cet échantillon est soumis à la chromatographie HPLC.

Après plusieurs essais, nous avons pu déterminer les caractéristiques optimales de la phase mobile permettant une séparation efficace, non seulement des dérivés métaboliques du DBF, mais également des produits résultant de la métabolisation de composés analogues à cet hydrocarbure ainsi que les métabolites secondaires et tertiaires (Chapitre III). Cette phase mobile est initialement constituée de 64 % de méthanol dans l'eau, durant les 10 premières minutes de l'élution puis la concentration d'alcool est augmentée graduellement pour atteindre 90 % au bout de 120 minutes. Il s'agit d'un gradient non linéaire dont les caractéristiques sont représentées sur la Figure II.4.

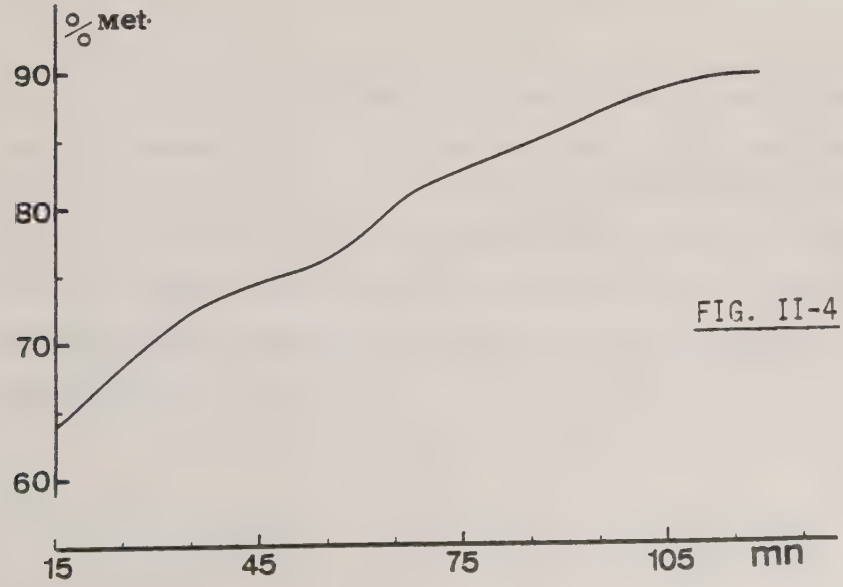


FIG. II-4 : Gradient d'élution.

B) Structure des métabolites formés

La Fig. II.5 illustre la séparation de l'ensemble des métabolites formés à la suite de l'incubation microsomale du DBF.

L'examen rapide de ce diagramme permet de distinguer trois groupes de métabolites. Il y a tout d'abord les composés élués durant les 45 premières minutes et qui sont constitués par les métabolites les plus polaires (étant donné que nous sommes en phase inversée). Le deuxième groupe est constitué par les deux composés 6 et 7 auxquels sont associés des temps de rétention compris entre 65 et 80 minutes. Il s'agit donc de métabolites nettement moins polaires que ceux du groupe précédent. La dernière classe est celle qui fait intervenir des temps de rétention supérieurs à 100 minutes. Dans ce groupe, nous allons rencontrer les métabolites les plus hydrophobes.

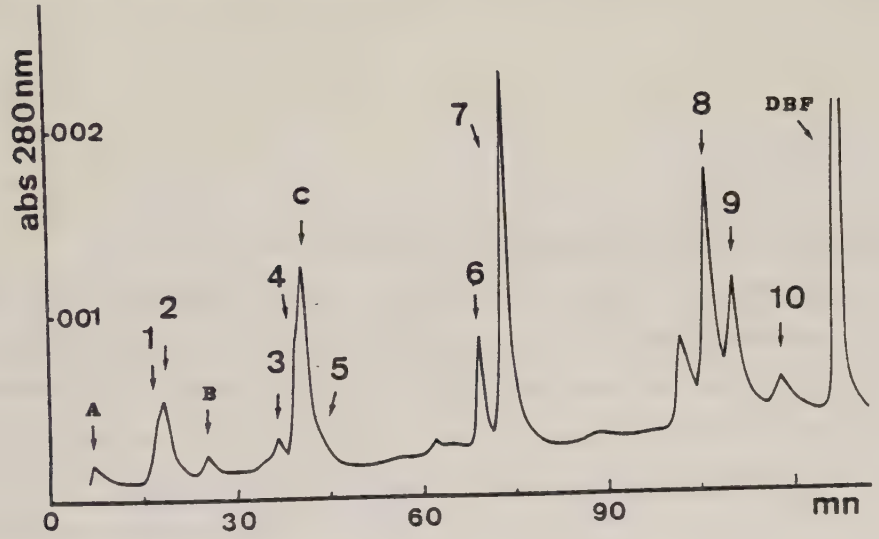


FIG. II-5 : Séparation en HPLC des métabolites du DBF (microsomes hépatiques de rats).

a) Structure des métabolites 8, 9 et 10

Ces trois composés appartiennent au groupe métabolique élué en fin du chromatogramme, et de ce fait il doit s'agir de produits peu polaires, vraisemblablement de nature phénolique, c'est-à-dire ayant conservé le même système aromatique que celui de l'hydrocarbure dont ils dérivent. En effet, mesurés à 77°K et dans l'éthanol absolu, les spectres de la fluorescence de ces trois métabolites sont compatibles avec une telle structure puisqu'ils sont comparables à celui du DBF (Fig. II.6).

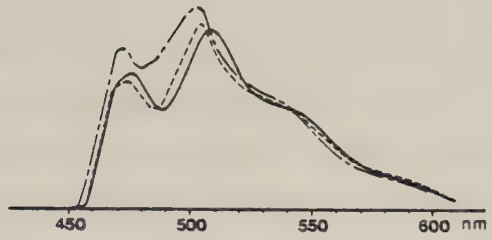


FIG. II-6 : Spectres de fluorescence non corrigés (77°K, éthanol absolu) du DBF (——), du métabolite 9 (---) et du métabolite 10 (.——.).

D'autre part, le caractère phénolique de ces composés peut être révélé par leurs spectres optiques d'absorption mesurés à différents pH (Fig. II.7). Les spectres sont en effet très différents au pH acide ou basique. Les valeurs de pK_a mesurés par titration alcaline des trois métabolites sont de l'ordre de 10,5. Les pK_a^* du premier état excité, estimés à partir du déplacement spectral vers les grandes longueurs d'onde de l'ordre de 3 000 cm^{-1}, correspondent à 4 et sont typiques des composés phénoliques (119).

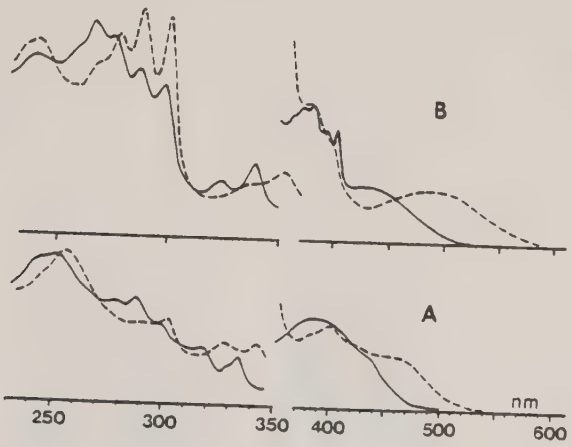


FIG. II-7 : Variations du spectre d'absorption en fonction du pH.
A, métabolite 9 ; B, métabolite 8
---- pH basique ; —— pH acide

L'analyse des spectres de RMN du proton de ces métabolites confirme cette attribution et permet de déterminer la structure exacte de chacun de ces composés. Sur la Fig. II.8, nous avons représenté la région aromatique du spectre du métabolite 10 avec l'attribution des résonances comprises entre 7 et 10 ppm. Comparé avec celui du DBF (Fig. II.9), ce spectre montre un important décalage vers les faibles champs, du proton 5, tandis que les protons substitués au noyau benzénique A sont très déplacés vers les hauts champs.

Ces effets associés aux expériences de découplage homonucléaire permettent d'attribuer au métabolite 10 la structure du 4-hydroxy-DBF.

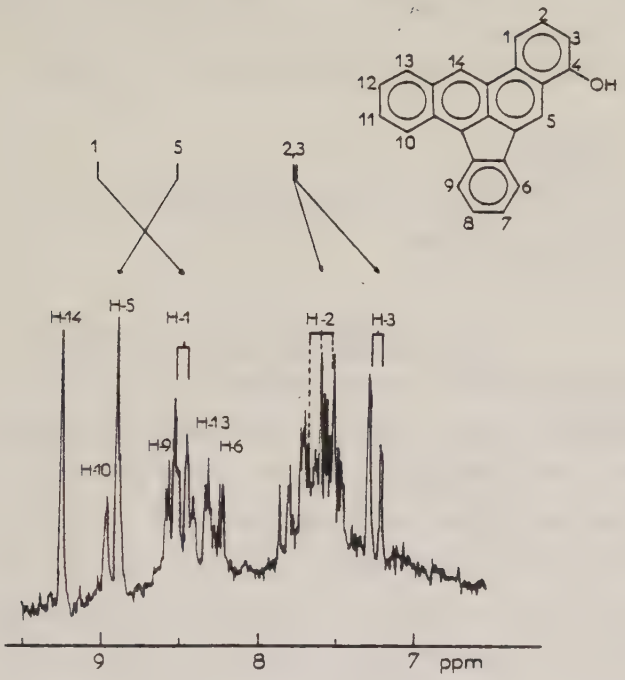


FIG. II-8 : Spectre RMN du métabolite 10 (acétone) : 4-hydroxy-DBF.

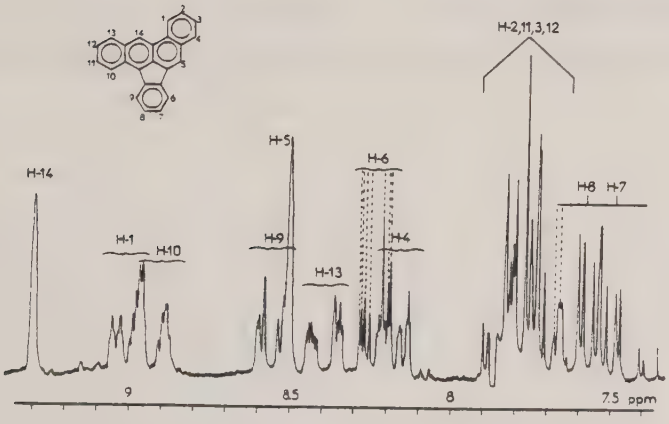


FIG. II-9 : Spectre RMN du DBF (acétone)

Les mêmes analyses ont été effectuées sur le spectre des deux composés 8 et 9 (Table II.2) auxquels sont ainsi attribuées respectivement les structures de 7-hydroxy-DBF et du 3-hydroxy-DBF.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DBF	9.02	7.8	7.8	8.17	8.52	8.23	7.49	7.58	8.56	8.94	7.8	7.8	8.40	9.30
met.8	8.89	7.7	7.7	8.16	8.42	7.72		7.17	8.34	8.83	7.7	7.7	8.35	9.17
met.9	8.85	7.38		7.59	8.37	8.21	7.53	7.53	8.55	8.91	7.7	7.7	8.40	9.14
met.10	8.50	7.62	7.27		8.92	8.37	7.55	7.55	8.55	8.93	7.75	7.75	8.39	9.25

(met.8 : 7-hydroxy-DBF ; met.9 : 3-hydroxy-DBF ; met.10 : 4-hydroxy-DBF)

Table II.2

Déplacements chimiques du DBF et des métabolites 8, 9 et 10 (réf. tétraméthylsilane)

b) Structure des métabolites 6 et 7

Leur comportement chromatographique n'est pas compatible avec une structure phénolique. Il s'agit de deux composés nettement plus polaires que le phénol, provenant vraisemblablement d'une destruction de l'aromaticité initiale du DBF. En effet, ceci peut être facilement mis en évidence par l'examen de leur spectre de luminescence, enregistré dans l'éthanol absolu à 77°K. La fluorescence associée au métabolite 7 se présente sous forme d'un spectre nettement décalé vers les courtes longueurs d'onde par rapport à celui du DBF. La Fig. II.10 révèle que les spectres d'excitation de ce métabolite et du 10,11,12,13-tétrahydro-DBF sont très comparables avec toutefois un hyperchromie de la dernière bande, du spectre d'excitation du métabolite. Ce composé résulte donc d'une destruction partielle de la conjugaison électronique qui semble affecter le cycle D de la molécule.

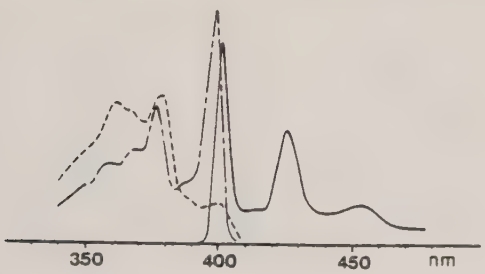


FIG. II-10: Spectres de luminescence (77°K, éthanol absolu). Fluorescence du met.7 (——). Spectre d'excitation du met.7 (·——·). Spectre d'excitation du 10,11,12,13-tetrahydro-DBF (---).

Quant au métabolite 6, nous avons constaté que son spectre de fluorescence se caractérise par un effet bathochrome vis-à-vis de celui de la molécule parente. En outre, il y a une forte analogie entre son spectre d'excitation et celui du benzo(a)fluoranthène (Fig. II.11). Il est donc possible dans ces conditions, d'associer ce métabolite à une modification de la conjugaison du cycle A du DBF.

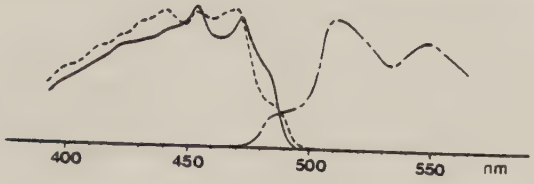


FIG. II-11: Spectres de luminescence (77°K, éthanol absolu). Fluorescence du met.6 (·——·). Spectre d'excitation du met.6 (---). Spectre d'excitation du B(a)F (——).

Les analyses en RMN de ces deux composés confirment ces structures moléculaires dans lesquelles il y a diminution de la conjugaison électronique.

La Fig. II.12 représente le spectre de RMN du proton du métabolite 7. Des résonances correspondant à des protons aliphatiques sont maintenant observées dans le domaine des faibles champs, entre 4 et 7 ppm.

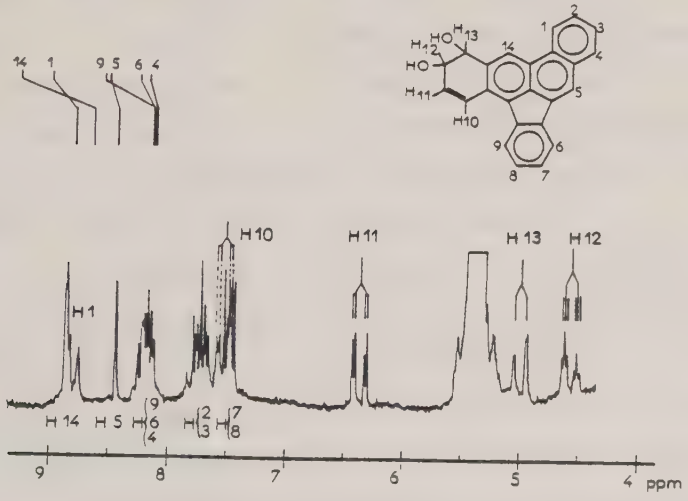


FIG.II-12 : Spectre RMN du métabolite 7 (acétone) : 12,13-dihydrodiol.

Sur la Table II.3, nous avons porté les déplacements chimiques associés aux deux métabolites après analyse de ces spectres. Les structures attribuées aux deux composés 6 et 7 correspondent respectivement au diéquatorial-trans-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-dibenzo(a,e)fluoranthène (3,4-trans-(EE)-dihydrodiol) et au diéquatorial-trans-12,13-dihydro-12,13-dihydroxy-dibenzo(a,e)fluoranthène (12,13-trans-(EE)-dihydrodiol).

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.6	7.52	6.33	4.58	5.03	8.54	8.17	7.51	7.51	8.51	8.87	7.7	7.7	8.29	8.96
met.7	8.79	7.7	7.7	8.18	8.43	8.18	7.47	7.47	8.18	7.52	6.36	4.56	5.00	8.85

TABLE II-3 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétramethylsilane (met.6 : 3,4-diol ; met.7 : 12,13-diol).

c) Structure des métabolites les plus polaires

Parmi les métabolites élués dans les 45 premières minutes du chromatogramme de la Fig. II.5, certains se présentent en très faibles quantités, et de ce fait n'ont pu être étudiés ; c'est le cas notamment des pics A et B. Par ailleurs, nous verrons plus loin, que les métabolites 1, 2 et 5 ne dérivent pas directement du DBF mais résultent d'une métabolisation secondaire simultanée de certains métabolites primaires. La structure de ces trois métabolites sera étudiée au cours du Chapitre III.

La détermination de la structure moléculaire des métabolites 4 et C requiert leur purification, ce qui est difficile dans la mesure où ils sont élués pratiquement ensemble. Cependant, nous avons constaté qu'en présence d'une certaine concentration de Norharman (voir Chapitre V), l'incubation du DBF se traduit par la disparition du métabolite C. Simultanément nous avons observé une importante augmentation de la quantité de produits 3 et 4 formés. Il a été ainsi possible d'étudier facilement leurs structures.

Le métabolite 3 présente à 77°K un spectre de luminescence analogue à celui du 12,13-trans(EE)-dihydrodiol. Sa structure est donc compatible avec un dihydrodiol associé au cycle D. Le même spectre de luminescence du métabolite 4, montre une analogie avec celui du 3,4-trans(EE)-dihydrodiol. Comme celui-ci, ce métabolite résulterait donc d'une destruction de la conjugaison du cycle A.

Les analyses des spectres RMN de ces deux métabolites (Table II.4) permettent d'attribuer facilement aux composés 3 et 4 les structures respectives du diaxal-trans-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-dibenzo(a,e)fluoranthène(10,11-trans (AA)-dihydrodiol) et du diaxal-trans-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-dibenzo(a,e)fluoranthène(1,2-trans-(AA)-dihydrodiol).

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.3	9.23	7.7	7.7	8.16	8.45	8.16	7.48	7.50	8.32	5.65	4.50	6.33	7.03	8.42
met.4	5.65	4.52	6.35	6.90	8.04	8.14	7.5	7.5	8.51	8.86	7.6	7.6	8.31	9.05

TABLE II-4 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétramethylsilane (met.3 :10,11-diol ; met.4 : 1,2-diol)

Quant au métabolite C, il nous a été impossible de déterminer sa structure avec autant de certitude. Toutefois, des spectres RMN de ce produit montrent l'existence au sein de cette structure d'une fonction dihydrodiol dont les deux groupements hydroxyles sont dans des conformations équatoriales et non axiales.

Néanmoins, le métabolite C, comme l'indique la Fig. II.5, présente un comportement chromatographique très différent de celui des trans-EE-dihydrodiol issus de la métabolisation primaire du DBF (pics 6 et 7). Cela laisse supposer que ce produit serait vraisemblablement un métabolite secondaire du DBF et non un métabolite primaire. En effet, les spectres de luminescence de ce métabolite enregistrés dans l'éthanol absolu à 77°K (Fig. II.13 et II.14) ne diffèrent de ceux du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (composé identifié en tant que métabolite du 12,13-dihydrodiol : voir Chapitre III) qu'au niveau de la finesse des bandes vibrationnelles de la fluorescence. Cela nous permet donc de proposer une structure au sein de laquelle sont associés deux groupements fonctionnels : un substituant hydroxyle et une fonction dihydrodiol portant sur la liaison 12,13.

FIG. II-13: Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (——) et du métabolite C (---).

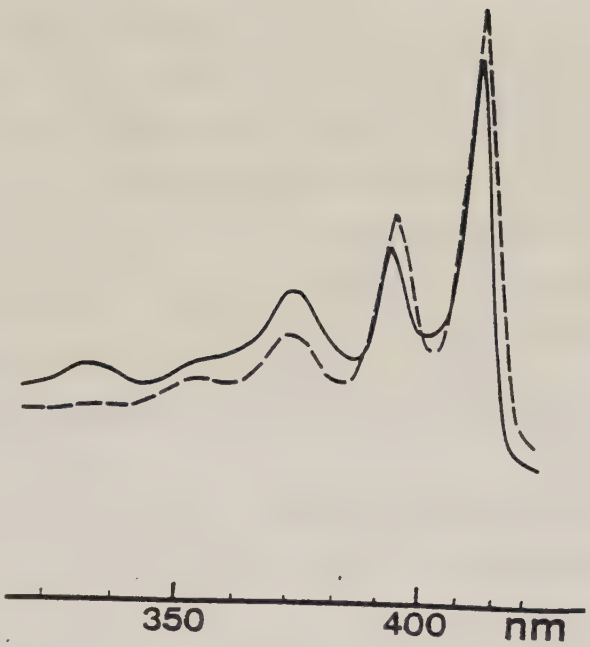


FIG. II-14: Spectres d'excitation de la fluorescence (77°K, éthanol absolu) du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (——) et du métabolite C (---).

c) Conclusions

Il apparaît clairement que les résultats expérimentaux concernant le métabolisme du "noyau benzanthracénique" du DBF, sont en accord, au moins qualitativement, avec les prévisions théoriques développées au début de ce chapitre. En effet, les quatre sites 1-2, 3-4, 10-11 et 12-13 ayant subi l'action des monooxygénases sont ceux associés aux indices de liaison les plus élevés. En revanche, les liaisons 2-3 et 11-12 dont les indices étaient faibles se sont révélées

inactives à l'égard des enzymes microsomales.
Nous constatons néanmoins l'absence d'une corrélation quantitative entre l'expérience et la théorie, dans la mesure où le 1,2-dihydrodiol et le 10,11-dihydrodiol sont très minoritaires par rapport au 3,4-dihydrodiol et au 12,13-dihydrodiol (les quatre indices de liaison associés à ces métabolites étant sensiblement les mêmes).

Aucun dihydrodiol portant sur le noyau E n'a pu être détecté. Cela laisse supposer que le 7-hydroxy-DBF résulte plutôt d'un mécanisme enzymatique faisant intervenir l'hydroxylation directe sur un carbone que de l'époxydation d'une liaison aromatique. Les hydroxylations directes sont des réactions qui affectent non seulement les composés aromatiques mais également des carbones aliphatiques. De ce fait, on peut penser que leur probabilité n'est pas liée directement aux indices de liaison. Dans ces conditions, la formation métabolique du 7-hydroxy-DBF n'est pas en contradiction avec les prédictions théoriques, lesquelles attribuent au cycle E un caractère benzénique et une réactivité faible vis-à-vis de l'époxydation enzymatique.

On peut remarquer cependant que malgré l'équivalence des carbones 6, 7, 8 et 9 (caractère benzénique du cycle E), l'hydroxylation en question a porté sur le carbone 7.

Au cours de la métabolisation du DBF, ce sont donc les sites 12-13, 3-4 et 6-7 (ou le sommet 7) qui sont oxydés préférentiellement. Bien que cette spécificité n'aille pas à l'encontre des résultats théoriques, elle semble montrer néanmoins que d'autres facteurs non simplement électroniques, interviennent dans le métabolisme du DBF.

Les coefficients d'extinction des principaux métabolites ont été approximativement déterminés après incubation microsomale de DBF marqué au tritium. Les valeurs ainsi obtenues étaient de 74.000 M^{-1} cm^{-1} (λ = 300 nm), pour le 12,13-dihydrodiol, 100.000 M^{-1} cm^{-1} (λ = 279 nm) pour le 3,4-dihydrodiol et 69.000 M^{-1} cm^{-1} (λ = 3.000 nm) pour le 7-hydroxy-DBF. Ces coefficients ont permis de doser ces trois métabolites de l'incubation effectuée dans les conditions opératoires indiquées au début de ce chapître (en utilisant 30 mg de protéine microsomale), nous avons obtenu 2,7 µg de 12,13-dihydrodiol, 1 µg de 3,4-dihydrodiol et 2 µg de 7-hydroxy-DBF. En tenant compte des deux phénols portant sur la liaison 3-4(3-hydroxy-DBF et 4-hydroxy-DBF), on s'aperçoit que les trois sites 12,13, 3-4 et 6-7 (ou le carbone 7) ont approximativement la même probabilité d'être oxydés.

Pour l'aspect biologique de cette étude métabolique, il est important de noter la formation de deux trans-EE-dihydrodiols. En effet, ceux-ci portent sur les liaisons 12-13 et 3-4 et, de ce fait, constituent des précurseurs potentiels de diol-époxydes vicinaux faisant intervenir les deux régions baies de la molécule. Il s'agit

donc de 3,7 µg de produit métabolique susceptibles de se transformer enzymatiquement en espèces biologiquement actives, si on admet ce modèle de réactivité.

III - METABOLISME DU 7-METHYL-DBF ET DU 7-HYDROXY-DBF

A) Introduction

Pour aussi puissant qu'il soit, le pouvoir cancérogène du DBF disparaît quand cette molécule est substituée par des groupements méthyle ou hydroxyle en position 7. Les études expérimentales effectuées sur des souris ont, en effet, montré que le 7-méthyl-DBF et le 7-hydroxy-DBF sont totalement dépourvus de toute activité cancérogène (F. Zajdela, résultats non publiés). De tels résultats contrastent, cependant, avec les observations selon lesquelles certaines substances aromatiques faiblement cancérogènes sont capables d'acquérir un puissant pouvoir tumoral, après avoir subi une ou plusieurs méthylations ; c'est le cas notamment du benz(a)anthracène (BA) et du chrysène (C) dont la faculté d'induire des cancers chez les animaux se trouve fortement exaltée après transformation en 8-méthyl-benz(a)anthracène (8-MBA) ou en 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (7,12,DMBA) et en 5-méthyl-chrysène (5-MeC).

Le rôle exact joué par ce groupement méthyle dans l'accroissement de l'activité cancérogène du BA et du C demeure cependant obscure. Toutefois, nous pouvons éliminer l'hypothèse selon laquelle ces substituants interviendraient par transformation métabolique en hydroxyméthyl ; en effet, des expériences de badigeonnage cutané ou d'injections intraveineuses effectuées sur des animaux de laboratoires n'ont révélé qu'une très faible activité cancérogène du 8-hydroxy-méthylbenz(a)anthracène, du 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène, du 7-méthyl-12-hydroxyméthylbenz(a)anthracène et au 7,12-dihydroxy-diméthyl-benz(a) anthracène (141,142).

On peut cependant constater que les groupements méthyles induisant l'accroissement de l'activité cancérogène des hydrocarbures aromatiques polycycliques, sont souvent situés dans une région baie de la molécule à laquelle ils appartiennent (143). Parmi de tels exemples figurent le 5-MeC, le 5,11-diméthyl-C, le 12-MBA, le 7,12-DMBA et certains dérivés méthylés du cyclypenta(a)phénanthrène. On est donc conduit à concevoir que la présence du groupement méthyle dans la région baie aboutit à un encombrement qui peut modifier la nature et la quantité de certains stéréoisomères issus de la métabolisation de l'hydrocarbure étudié. C'est ainsi que l'oxydation chimique du trans-EE-3,4-dihydrodiol provenant du 7,12-DMBA conduit à la formation de deux époxydiols vicinaux stéréoisomères, tandis que le même dihydrodiol issu du benz(a)anthracène non substitué est converti principalement en un seul produit (8).

Cependant, l'hypothèse selon laquelle les groupements méthyles interviendraient dans l'accroissement du pouvoir cancérogène de certains hydrocarbures aromatiques polycycliques en favorisant la formation métabolique de stéréoisomères plus réactifs biologiquement, ne peut pas être généralisée à tous les hydrocarbures méthylés cancérogènes. En effet, les groupements méthyles introduits dans le 7-MBA et le 8-MBA, composés à haut pouvoir tumoral, n'ont aucun effet d'encombrement au niveau de la région baie et, de ce fait, ne peuvent pas modifier directement la stéréoisomérie relative des métabolites de cette région.

En ce qui concerne le 7-méthyl-DBF et le 7-hydroxy-DBF, les groupements substituants ont, par contre, un pouvoir désactivant. D'autre part, les deux régions baies de la molécule ne subissent aucun effet d'encombrement dû à la présence de ces groupements. Cette perte d'activité est donc difficile à interpréter. Nous essayerons cependant dans ce paragraphe, de dégager certaines caractéristiques du métabolisme du 7-méthyl-DBF et du 7-hydroxy-DBF, et de les corréler à l'absence d'effet biologique de ces deux substances.

B) Métabolisme du 7-méthyl-DBF

Nous avons effectué une incubation microsomale du 7-méthyl-DBF identique à celle ayant servi à étudier le métabolisme du DBF. Le seul produit important formé au cours de ce métabolisme correspond à l'hydroxylation du carbone aliphatique du groupement méthyle. Cette structure a été identifiée par RMN.

Les autres métabolites, parmi lesquels pourraient se trouver les dihydrodiols au niveau des deux liaisons 3-4 et 12-13, sont très minoritaires. Ainsi, il apparaît que le groupement méthyle en position 7 inhibe fortement la formation des dihydrodiols susceptibles de subir l'époxydation vicinale selon la théorie de la région baie.

C) Métabolisme du 7-hydroxy-DBF

a) Indices de liaison

	1-2	2-3	3-4	6-7	7-8	8-9	10-11	11-12	12-13
DBF	0.692	0.626	0.703	0.675	0.645	0.678	0.722	0.599	0.727
7-OH-DBF	0.692	0.627	0.703	0.652	0.625	0.683	0.722	0.599	0.728

TABLE II-5 : Indices de liaison du DBF et du 7-hydroxy6DBF

La table II.5 montre la comparaison des indices de liaison calculés pour le 7-hydroxy-DBF et le DBF. On constate que le groupement hydroxyl n'a pratiquement aucun effet sur les valeurs de ces indices. Du point de vue électronique, on doit s'attendre à ce que le noyau benzanthracénique du 7-hydroxy-DBF soit oxydé d'une manière analogue à celui du DBF non substitué.

b) Incubation et structure des métabolites

La Fig. II.15 montre le profil d'élution des métabolites formés à la suite de l'incubation microsomale du 7-hydroxy-DBF. Nous constatons que l'ensemble du métabolisme demeure très faible comparativement à celui de l'hydrocarbure non substitué. Parmi les trois métabolites minoritaires observables sur la Fig. II.15, seuls les composés 1 et 2 ont été étudiés. En effet, compte tenu de son comportement chromatographique, le métabolite associé au pic 3, doit résulter d'une hydroxylation donnant naissance à un diphénol.

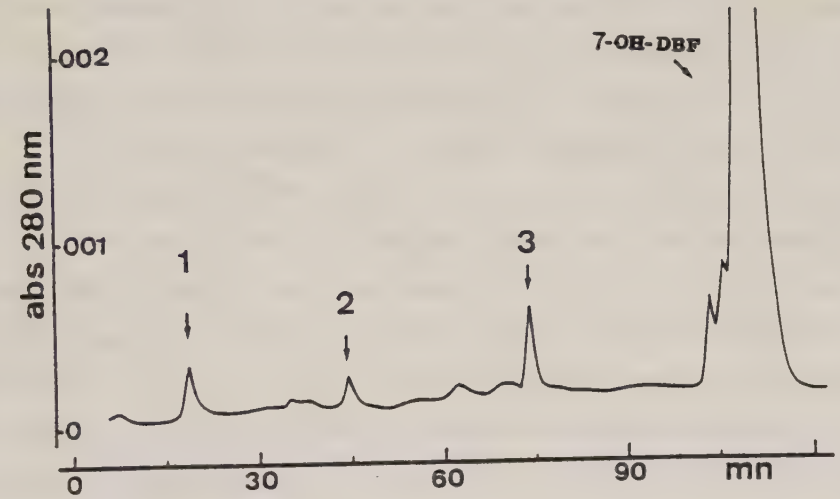


FIG. II-15: Séparation en HPLC des métabolites du 7-hydroxy-DBF (microsomes hépatiques de rat).

Dans l'éthanol absolu, le métabolite 1 est fluorescent ; le spectre montre un déplacement spectral vers les courtes longueurs d'onde par rapport à celui du 7-hydroxy-DBF. Un tel comportement spectral est compatible avec une structure résultant d'une destruction de la conjugaison du cycle D.

Les analyses des spectres de RMN (Tableau II.6) permettent d'attribuer au métabolite 1 la structure du 7-hydroxy-10,11-dihydrodiol, dans laquelle les deux groupements hydroxyls adoptent des conformations axiales.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.1	8.8			8.1	8.32		-	7.0	8.10	5.5	4.5	6.3	7.0	8.32
met.2	7.50	6.35	4.61	5.05	8.44	7.63	-	6.99	8.30	8.75	7.6	7.6	8.24	8.79

TABLE II-6 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.1 : 7-hydroxy-10,11-diol ; met.2 : 7-hydroxy-3,4-diol)

Le métabolite 2 est très faiblement fluorescent. Son spectre, enregistré aux fortes sensibilités de l'appareil est comparable à celui du 3,4-dihydrodiol. Par ailleurs, l'analyse par découplage des spectres de RMN (Table II.6) confirme cette prédiction et attribue au métabolite 2 la structure du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol. Remarquons que ces deux composés 1 et 2 sont également présents sur le chromatogramme (Fig. II.5) des métabolites du DBF. En effet, compte tenu de leurs comportements chromatographique et spectroscopique, les métabolites 1 et 2 s'identifient respectivement aux pics 2 et 5 de la Fig. II.5.

Il est intéressant de noter l'incapacité des enzymes microsomales d'oxyder le 7-hydroxy-DBF en dihydrodiols portant sur les liaisons 1-2 et 12-13.

Le seul métabolite susceptible de subir l'époxydation vicinale, selon les critères de la région baie, est donc le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol. Celui-ci est cependant très minoritaire. En utilisant le coefficient d'extinction attribué au 3,4-dihydrodiol, on trouve que la quantité du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol formée lors de l'incubation du 7-hydroxy-DBF correspond approximativement à 0,17 µg. Ainsi la présence du groupement hydroxyle en position 7 a inhibé qualitativement et quantitativement la formation des précurseurs des époxydes vicinaux réactifs. Celle-ci s'effectue, en effet, avec un rendement au moins 20 fois plus faible que pour le DBF non substitué (3,7 ug de dihydrodiols).

d) Conclusion

La substitution de l'hydrogène 7 du DBF par un groupement méthyle ou hydroxyle aboutit donc, à une inhibition très importante du métabolisme du noyau benzanthracénique. L'absence d'effets biologiques observée pour le 7-méthyl-DBF et le 7-hydroxy-DBF peut être ainsi corrélée à cette inhibition métabolique. Cela laisse donc supposer que les groupements substituant peuvent modifier les propriétés biologiques d'un hydrocarbure uniquement par l'altération de son métabolisme.

Lorsqu'on incube le 7-hydroxy-DBF en présence des enzymes microsomales, les deux liaisons 1-2 et 12-13 ne sont pas attaquées par les

monooxygénases. Dans ces conditions, il est important de noter qu'il n'y a pas de parallélisme entre les voies métaboliques du 7-hydroxy-DBF et celles de l'hydrocarbure non substitué. Cette spécificité enzymatique n'est pas corrélée aux indices de liaison (Table II.5) qui laissaient prévoir l'époxydation des quatre liaisons 1-2, 3-4, 10-11 et 12-13 du 7-hydroxy-DBF. Le groupement hydroxyle, en altérant le métabolisme du DBF, fait donc intervenir d'autres facteurs que ceux liés aux considérations électroniques. Notons toutefois, que l'époxydation de la liaison 10-11 ne se trouve pas inhibée par la présence du groupement hydroxyle. Nous constatons même une légère augmentation du 10-11-dihydrodiol quand le DBF est substitué en 7.

CHAPITRE III

Métabolisme secondaire du dibenzo(a,e)fluoranthène : époxydation vicinale des trans-EE-dihydrodiols

I - INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la nature métabolique de l'activation des cancérogènes chimiques appartenant à la série des hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'une d'elles est de loin la plus admise actuellement ; elle fait intervenir comme métabolites "ultimes" des diol-époxydes vicinaux dans lesquels un des deux carbones liés à l'atome d'oxygène de l'époxyde est situé dans une région "baie" de la molécule (79). Cette hypothèse, en fait, dérive d'une théorie quantique développée par Jerina, selon laquelle ces diol-époxydes sont facilement convertis en ions carbonium intermédiaires de réactions covalentes avec les macromolécules cellulaires (voir Chapitre I).

Différentes étapes enzymatiques doivent donc être franchies par l'hydrocarbure aromatique polycyclique, avant qu'il soit transformé en un métabolite "ultime" de ce type. Dans un premier temps, la molécule subit l'action des monooxygénases pour aboutir à la formation d'un dihydrodiol dont les groupements hydroxyles doivent être adjacents à une liaison éthylénique située dans la région baie. Alors, les mêmes monooxygénases doivent intervenir à nouveau pour transformer le dihydrodiol en un époxyde vicinal. Cette deuxième oxydation est donc une étape particulièrement déterminante dans l'activation métabolique des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Bien qu'on ne sache encore que peu de choses sur l'ensemble des facteurs régissant l'évolution métabolique des dihydrodiols, la structure électronique de la liaison éthylénique, semble jouer un rôle important dans l'orientation du métabolisme du dihydrodiol, vers l'époxydation vicinale. C'est ainsi que des études métaboliques quantitatives effectuées dans plusieurs laboratoires ont pu montrer que le 7,8-dihydrodiol-benzo(a)pyrène (80,81), le 1,2-dihydrodiol-chrysène et le 1,2-dihydrodiol-phenanthrène (82) sont majoritairement convertis en époxydes vicinaux sous l'action catalytique des monooxygénases microsomales. Ces trois dihydrodiols ont adopté des conformations quasiment équatoriales (trans-EE-dihydrodiols) de leurs groupements hydroxyles. Dans l'état actuel de nos connaissances, les trans-AA-dihydrodiols (diaxiaux) ne semblent pas manifester la même évolution métabolique. C'est le cas du 9,10-dihydrodiol-benzo(e)pyrène et du

9,10-dihydrodiol-benzo(a)pyrène dont le métabolisme étudié in vitro en présence de microsomes hépatiques de rat n'aboutit pas à la formation de diol-époxydes vicinaux (83,84). Toutefois, ces résultats contrastent avec les observations récentes selon lesquelles la métabolisation, in vitro, du trans-AA-1,2-dihydrodiol-benzo(a)-anthracène (85), du trans-AA-1,2-dihydrodiol-dibenzo(a,h)anthracène (86) et du trans-AA-3,4-dihydrodiol-chrysène (86,87), serait principalement orientée vers l'époxydation vicinale. Cette controverse n'est pas encore réglée mais elle semble indiquer que les facteurs électroniques ne sont pas les seuls à régir l'évolution métabolique des dihydrodiols.

On peut concevoir que l'introduction de certaines contraintes conformationnelles au sein de la structure d'un dihydrodiol, pourrait empêcher l'intéraction enzyme-substrat et aboutir ainsi, indirectement, à une faible réactivité de la liaison éthylénique du dihydrodiol.

Pour que l'époxydation vicinale ait lieu, il faut une certaine orientation du substrat au cours de sa fixation sur le site actif de l'enzyme, telle que la liaison éthylénique puisse se situer au voisinage immédiat du site oxygénant. Il en résulte qu'un dihydrodiol n'est pas forcément converti automatiquement, en présence des monooxygénases, en époxyde(s) vicinal. C'est la raison pour laquelle, il nous a paru nécessaire de rechercher les preuves expérimentales de l'existence de telles voies enzymatiques pour les dérivés métaboliques du DBF.

Nous avons vu, au Chapitre précédent, que le 3,4-dihydrodiol et le 12,13-dihydrodiol sont les seuls métabolites primaires du DBF susceptibles de subir l'époxydation vicinale selon les critères de la théorie de Jerina.

Nous essayerons de voir, au cours de ce Chapitre, si une telle activation métabolique peut avoir lieu et si les trans-EE-dihydrodiols de cet hydrocarbure non alternant présentent des analogies métaboliques avec les dihydrodiols correspondants de la série des hydrocarbures aromatiques polycycliques alternants.

II - Prévisions théoriques et conditions opératoires

A) Indices de liaison

Le Tableau III.1 présente les indices de liaison calculés pour le 3,4-dihydrodiol et le 12,13-dihydrodiol. On constate que ces indices sont pratiquement identiques à ceux du DBF, exceptés pour les deux indices associés aux doubles liaisons éthyléniques. Ceux-ci passent de 0,692 à 0,889 pour le 3,4-dihydrodiol et de 0,722 à 0,900 pour le 12,13-dihydrodiol.

Du point de vue strictement électronique, on devrait s'attendre dans ces conditions, à ce que les deux dihydrodiols soient convertis majoritairement en époxydes vicinaux.

	1-2	2-3	3-4	6-7	7-8	8-9	10-11	11-12	12-13
DBF	0.692	0.626	0.703	0.675	0.645	0.678	0.722	0.599	0.727
3,4-diol	0.889	-	-	0.678	0.642	0.680	0.725	0.595	0.731
12,13-diol	0.699	0.621	0.708	0.675	0.647	0.677	0.900	-	-

TABLE III-1 : Indices de liaison du DBF, du 3,4-dihydrodiol et du 12,13-dihydrodiol

B) Incubation microsomale et isolement des métabolites

Les deux dihydrodiols ont été incubés en présence de microsomes hépatiques de rats auxquels nous avons administré, 48 heures avant d'être sacrifiés, un traitement au 3-méthylcholanthène. 3 ml d'une suspension microsomale (0,05 M Tris-HCl : 0,25 M sucrose pH 7,5 - 10 mg de protéines par ml) sont introduits dans 18,5 ml d'une solution aqueuse contenant 7,668 µmoles de NADPH, 1,065 mmole de Tris-HCl pH 7,5 et 63,9 µmoles de $MgCl_2$). A ce mélange réactionnel sont ajoutés 85 µg de 3,4-dihydrodiol ou 80 µg de 12,13-dihydrodiol, préalablement dissous dans 150 µl d'acétone.

Les deux incubations sont effectuées à 37°C pendant 30 minutes, temps durant lequel de fréquentes agitations des échantillons sont nécessaires pour assurer une bonne oxygénation du milieu microsomal. La réaction enzymatique est arrêtée par addition d'acétate d'éthyle qui est utilisé pour l'extraction des métabolites produits par chacune des deux incubations.

Les phases organiques récupérées sont évaporées sous vide à 37°C. Les échantillons obtenus sont ensuite redissous dans 0,85 ml (0,7 ml méthanol, 0,15 ml H_2O) et injectés à l'entrée de la colonne chromatographique. La nature de la phase mobile, ainsi que le gradient d'élution utilisés sont identiques à ceux décrits au chapitre précédent.

Les divers métabolites formés sont isolés séparément et soumis après évaporation aux différentes analyses spectroscopiques (absorption, fluorescence et RMN).

III Métabolisme du 3,4-dihydrodiol

La Fig. III.1 montre le profil d'élution caractéristique des différents constituants métaboliques introduits à l'entrée de la colonne chromatographique. Un examen rapide de ce chromatogramme révèle la formation de quatre principaux produits métaboliques du 3,4-dihydrodiol.

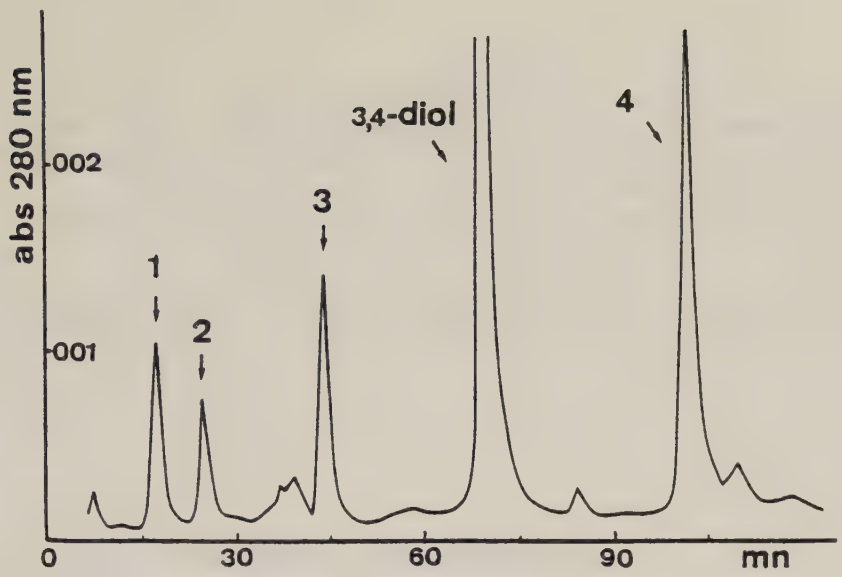


FIG. III-1 : Séparation en HPLC des métabolites du 3,4-dihydrodiol (microsomes hépatiques de rat).

Dans la mesure où les monooxygénases microsomales catalysent généralement des réactions au cours desquelles de nouveaux groupements oxygénés sont introduits dans le substrat, on devrait s'attendre à ce que l'ensemble des métabolites soit constitué uniquement de composés plus polaires que la structure parente. Tel n'est pas le cas en ce qui concerne le métabolisme du 3,4-dihydrodiol. En effet, le métabolite associé au pic 4 de la Fig. III.1 est élué, en chromatographie en "phases inversées", nettement après l'hydrocarbure dont il dérive. Cela laisse supposer que ce dihydrodiol peut subir certaines réactions enzymatiques qui modifient complètement sa structure initiale.

A) Métabolisme total

Celui-ci peut être déterminé en dosant la fraction du 3,4-dihydrodiol non transformé. Pour ce faire, nous l'avons collectée en suivant l'absorption à 280 nm. Après évaporation à sec, le produit résiduel est redissous dans un volume approprié d'éthanol et soumis à un dosage spectrophotométrique en utilisant un coefficient d'extinction égal à 100.000 M^{-1} cm^{-1} pour une longueur d'onde de 279 nm. Les résultats de ce dosage portés dans le Tableau III.2 montrent que, dans les conditions opératoires indiquées plus haut, 74 % du substrat initial ont été transformés par les enzymes microsomales. Trois molécules de dihydrodiol sur quatre ont donc réagi au cours de l'incubation catalytique.

3,4-dihydrodiol incubé	3,4-dihydrodiol récupéré	3,4-dihydrodiol métabolisé	% métalisé
85 µg	22 µg	63 µg	74

TABLE III-2 : Métabolisme total du 3,4-dihydrodiol.

B) Structure des métabolites du 3,4-dihydrodiol

1. Structure et formation du produit 4

La polarité de ce métabolite, révélée par son comportement chromatographique (Fig. III.1) impose une structure qui diffère forcément de celle d'un 3,4-dihydrodiol substitué (hydroxy-3,4-dihydrodiol) ou d'un bis-dihyrodiol. De telles structures correspondraient en effet à des composés plus polaires que l'hydrocarbure parent qui, dans ces conditions de chromatographie à "phases inversées" serait le dernier à être élué.

L'élucidation de la structure de ce métabolite nécessite des études spectroscopiques. Une difficulté majeure nous est apparue au cours de l'isolement de ce produit, se traduisant par sa transformation irréversible en un précipité noir quand l'échantillon récolté par HPLC était évaporé à sec.

Néanmoins, avec certaines précautions (évaporation effectuée à des températures relativement basses), il a été possible de récupérer une quantité de ce métabolite intact permettant l'enregistrement des spectres de luminescence et de RMN.

A température ordinaire, aucune fluorescence n'est observable dans des solutions aqueuses (méthanol-eau) de ce métabolite, provenant de la phase mobile éluante. L'étude en milieu rigide (à 77°K dans l'éthanol absolu) a révélé, en revanche, l'existence d'une émission qui a pu être enregistrée. La Fig. III.2 compare deux spectres d'excitation de fluorescence obtenus pour le métabolite 4 et pour le 12-hydroxy-DBF (obtenu par déshydratation du 12,13-dihydrodiol). La similitude entre ces deux spectres permet de supposer que les deux produits présentent des structures aromatiques analogues. Cela ne peut résulter que d'une disparition de la fonction aliphatique du 3,4-dihydrodiol avec régénération de la double liaison délocalisée entre les deux carbones 3 et 4.

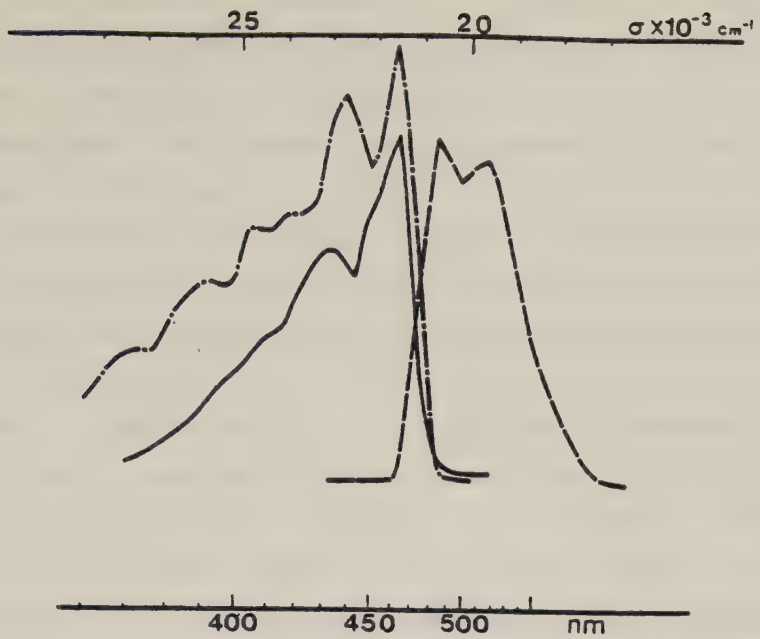


FIG. III-2 : Spectres de luminescence (77°K, éthanol absolu). Fluorescence du met.4 (---). Spectre d'excitation du met.4 (——). Spectre d'excitation du 12-hydroxy-DBF (·——·).

Le spectre RMN de ce métabolite a été enregistré dans le méthanol deutérié. L'examen de ce spectre a confirmé la disparition des résonances des protons aliphatiques et éthyléniques associés initialement au 3,4-dihydrodiol.

L'analyse de ce spectre, par comparaison avec celui du DBF (Table III.3) a montré que seul le cycle A est chimiquement modifié avec, cependant, un système aromatique analogue à celui du DBF et que les deux hydrogènes H_3 et H_4 ont été substitués par des groupements hydroxyles.

Le métabolite 4 a donc la structure de 3,4-dihydroxy-DBF (diphénol ou catechol). Une telle structure est en accord avec le comportement chromatographique et avec ses propriétés spectrales de luminescence.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.4	8.34	7.32	-	-	8.75	8.2	7.6	7.7	8.44	8.80	7.6	7.6	8.2	8.96

TABLE III-3 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.4 : 3,4-diphénol)

Les mécanismes conduisant à la formation du 3,4-diphénol à partir de 3,4-dihydrodiol est inconnu. De telles transformations n'ont jamais été signalées par d'autres auteurs effectuant des études métaboliques, en présence de la fraction microsomale, sur des dihydrodiols appartenant à d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Nous devons cependant exclure la possibilité d'une transformation spontanée, pouvant avoir lieu au cours de l'incubation du 3,4-dihydrodiol. En effet, lorsque celle-ci est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment mais en absence de NADPH, elle aboutit à la formation d'aucun des quatre principaux métabolites et particulièrement, le 3,4-diphénol. Toutefois, au cours de cette incubation témoin, nous avons constaté qu'une très faible fraction de dihydrodiol, avait subi une déshydratation aboutissant à la formation du 3-hydroxy-DBF et du 4-hydroxy-DBF. Ces deux phénols sont d'ailleurs présents sur la Fig. III.1 et correspondent aux deux pics mineurs élués juste après le métabolite 4, c'est-à-dire le 3,4-diphénol.

Ces résultats montrent donc que la formation de ce métabolite ne peut résulter que d'un mécanisme enzymatique nécessitant la présence du cofacteur. Globalement, la conversion du 3,4-dihydrodiol en diphénol, peut être assimilée à une déshydrogénation. Ayengal et coll. ont mis en évidence, en 1959, la présence d'une dihydrodiol-déshydrogénase qui est capable de transformer le benzène dihydrodiol (1,2-dihydroxy-cyclohexa-3,5-diène) en catéchol (9). Il s'agit en fait, d'une enzyme cytosolique à $NADP^+$ (ou NAD^+) dont les propriétés physiques et catalytiques ont été étudiées récemment par Vogel (88).

Les biotransformations subies par des dihydrodiols dérivés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, en présence de la fraction cytosolique d'un homogénat hépatique, pourraient résulter de l'action d'une telle déshydrogénase (89,90). Par ailleurs, quand le test d'Ames est effectué sur Salmonella typhimurium en présence de cette dihydrodiol deshydrogénase, l'effet mutagène du benzo(a)pyrène peut être réduit jusqu'à 50 % (91). Ce résultat peut facilement s'interpréter en admettant que cette enzyme est capable d'oxyder les dihydrodiols selon une voie différente de celle qui aboutit aux métabolites mutagènes, c'est-à-dire les diol-époxydes.

Ainsi cette enzyme cytosolique semble pouvoir réagir avec les dihydrodiols autres que le 1,2-dihydroxy-cyclohexa-3,5-diene, et ceci en dépit de l'absence de preuves directes montrant la formation de catéchols à partir de ces dihydrodiols.

Bien que nos résultats montrent indiscutablement qu'une transformation enzymatique d'un dihydrodiol, appartenant à un hydrocarbure aromatique polycyclique, en catéchol, est possible, il est cependant improbable que cette

conversion soit liée à l'action de la dihydrodiol-deshydrogénase. Deux arguments plaident en faveur de cette interprétation. Tout d'abord, l'incubation métabolique du 3,4-dihydrodiol est effectuée en présence de la fraction microsomale faisant donc intervenir des enzymes membranaires et non cytosoliques. Le deuxième argument résulte de la nature du cofacteur nécessaire à la transformation du dihydrodiol en catéchol. En effet, c'est la forme réduite et non oxydée qui permet cette réaction catalytique. La Fig. III.3 montre la séparation des métabolites provenant d'une incubation du 3,4-dihydrodiol en présence de $NADP^+$. Ceux-ci sont pratiquement inexistants. L'apparition du 3,4-diphénol ne peut donc résulter de l'action de la dihydrodiol-deshydrogénase qui requiert la forme oxydée du cofacteur, $NADP^+$.

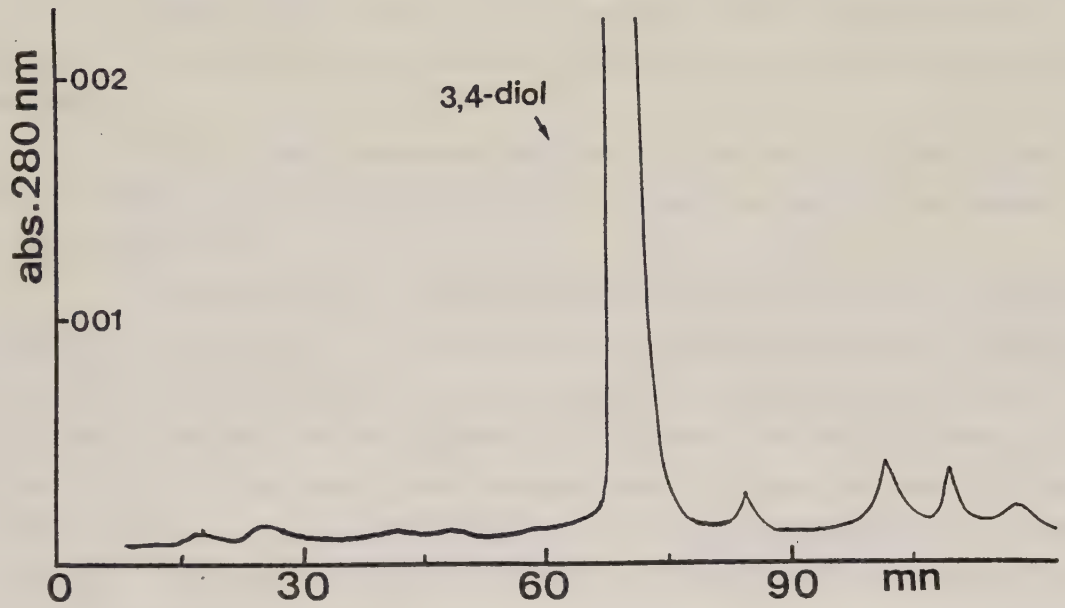


FIG. III-3. – Séparation des métabolites du 3,4-dihydrodiol en présence du $NADP^+$

Par ailleurs, nous avons constaté que l'incubation microsomale du 4-hydroxy-DBF aboutit, avec un très grand rendement, à la formation du même diphénol. Il s'agit donc vraisemblablement d'une hydroxylation directe, effectuée par les monooxygénases microsomales, au niveau du carbone 3 du composé phénolique.

Tous les faits expérimentaux qui viennent d'être mentionnés, permettent de supposer que la transformation du 3,4-dihydrodiol en 3,4-diphénol est due à l'action d'une enzyme microsomale ayant besoin de NADPH. Cette transformation pourrait se faire en deux étapes : une deshydratation aboutissant au 4-hydroxy-DBF suivie par l'hydroxylation de ce dernier sur le carbone 3.

1. Structure des métabolites 1,2 et 3

Du fait de leur comportement chromatographique en "phases inversées" (Fig. III.1), ces trois métabolites doivent posséder des polarités plus prononcées que celle de l'hydrocarbure dont ils dérivent. De telles structures sont compatibles avec celle du dihydrodiol initial sur laquelle viendrait s'ajouter d'autres groupements polaires oxygénés (hydroxyle ou autre fonction dihydrodiol ...).

L'élucidation de ces trois structures sera basée sur les données spectroscopiques de la fluorescence et de la résonance magnétique protonique.

a) Caractéristiques spectrales de fluorescence

L'étude des spectres de la fluorescence a été entreprise dans le but d'essayer d'obtenir des informations sur l'étendue du système conjugué de chaque métabolite.

Pour ce faire, nous avons isolé les trois composés qui après évaporation, ont été repris chacun par 0,4 ml d'éthanol absolu et soumis aux mesures de fluorescence à 77°K.

Le métabolite 3 ne montre qu'une très faible luminescence. Celle-ci est toutefois très comparable à la fluorescence du 3,4-dihydrodiol. Cela laisse donc supposer que la délocalisation des électrons π associés aux cycles benzéniques D et E n'a pas subi de modification importante. Par ailleurs, les spectres d'absorption de ce métabolite sont déplacés réversiblement selon qu'ils sont enregistrés en milieu acide ou basique. Un tel comportement est très caractéristique des composés phénoliques. Il en résulte que la structure du métabolite 3 est très compatible avec celle d'un hydroxy-dihydrodiol.

En solution éthanolique à 77°K, le produit 1 présente un spectre de fluorescence avec un déplacement hypsochrome marqué par rapport à celui du composé parent (Fig. III.4). On peut donc lui attribuer une structure dans laquelle la délocalisation électronique est moins prononcée que celle du 3,4-dihydrodiol. Ceci implique une réduction partielle de la conjugaison au niveau de l'un des deux cycles D ou E de la molécule.

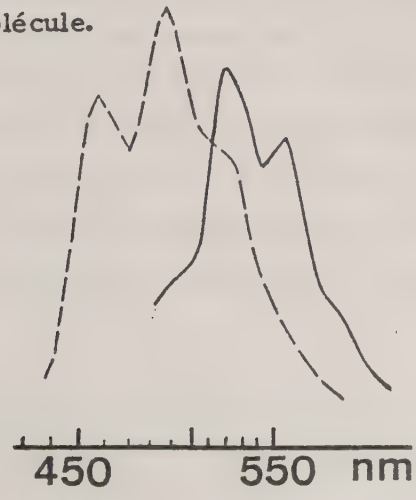
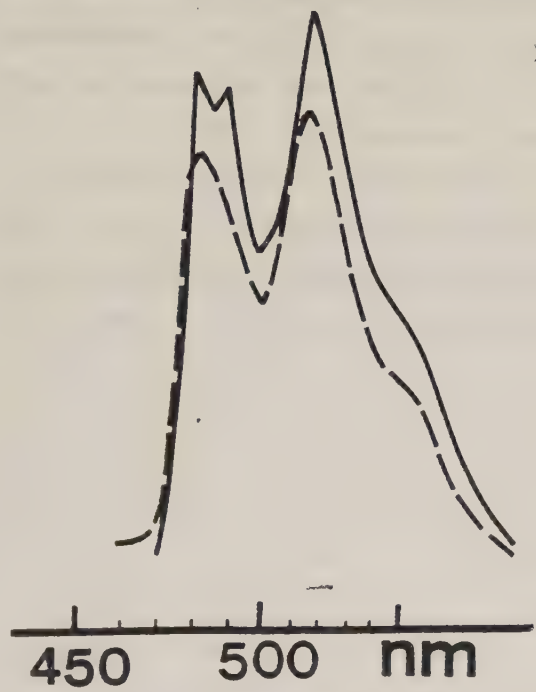


FIG. III-4. – Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du mét.1 (----) et du 3,4-dihydrodiol (——)

Les mesures de luminescence effectuées sur le métabolite 2 montrent d'une part, que le spectre de fluorescence est pratiquement identique à celui du benzo(a)fluoranthène (Fig.III.5a) et d'autre part, que le spectre d'excitation de la fluorescence coïncide également, en position des bandes, avec celui obtenu pour ce dernier (Fig. III.5b). Nous en concluons donc que le métabolite 2 et le benzo(a)fluoranthène sont associés à des systèmes conjugués analogues et que la structure de ce métabolite est fort probablement celle d'un tétrol, c'est-à-dire, un composé résultant de l'époxydation vicinale du 3,4-dihydrodiol.



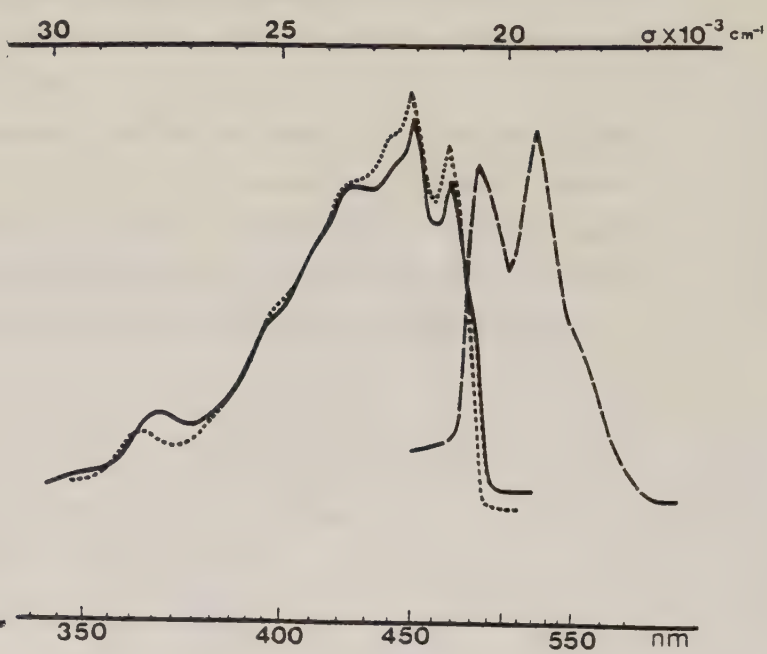


FIG. III-5a : Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du met.2 (---) et du B(a)F (——).

FIG. III-5b : Spectres d'excitation (77°K, éthanol absolu) du met.2 (---) et du B(a)F (——).

b) Etude par résonance magnétique nucléaire

Les études spectroscopiques de RMN effectuées sur le métabolite 3 montrent qu'il s'agit d'une structure moléculaire dans laquelle est conservée la fonction dihydrodiol parente. En effet, celle-ci est révélée par les résonances caractéristiques situées dans le domaine des faibles et moyens champs et correspondant aux protons aliphatiques et au proton éthylénique en position 2. Les déplacements chimiques dérivés des analyses spectrales sont reportés dans le

Tableau III.4. Ces résultats s'interprètent facilement par l'apparition d'un groupement hydroxyle en position 7 de la molécule. La structure du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol est ainsi attribuée au métabolite 3.

Le spectre RMN du métabolite 1 enregistré dans l'acétone deutériée et les déplacements chimiques correspondant (Table III.4) montrent l'apparition d'une nouvelle fonction dihydrodiol portant sur la liaison 12-13 qui vient donc s'ajouter à la première fonction dihydrodiol de l'hydrocarbure parent. Il s'agit donc du 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-12,13-dihydro-12,13-dihydroxy-DBF (3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol). Les analyses spectrales ont permis, en outre, de montrer que les groupements hydroxyles associés à chacune des deux fonctions dihydrodiol, adoptent des conformations quasiment équatoriales.

La Fig. III.6 présente le spectre RMN du métabolite 2. Nous constatons la disparition des résonances attribuées au proton 2 de la molécule parente, c'est-à-dire celles qui étaient situées entre 6 et 7 ppm. Simultanément d'autres raies apparaissent dans la région des faibles champs (de 4 à 6 ppm) qui s'ajoutent à celles des protons 3 et 4. Il doit donc y avoir disparition de la liaison éthylénique 1-2.

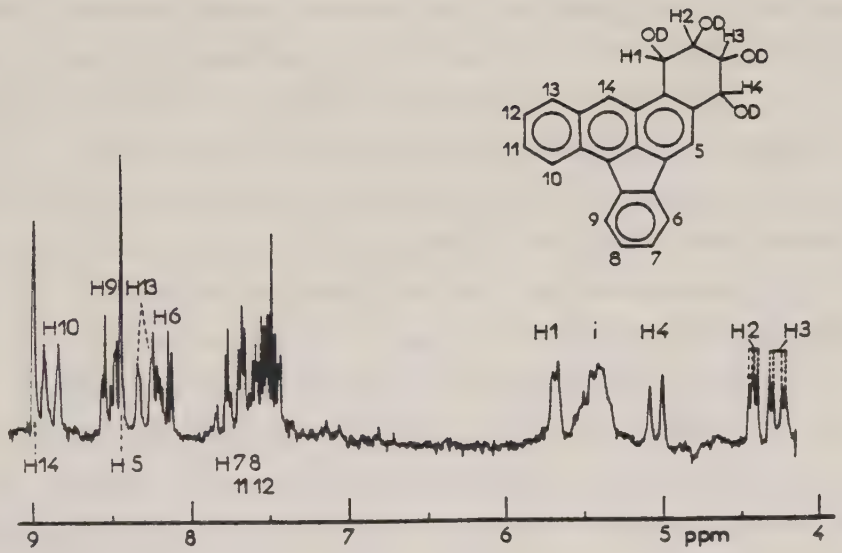


FIG. III-6: Spectre RMN du met.2 : 1,2,3,4-tétrol (acétone)

Les déplacements chimiques révélés des analyses spectrales (Table III.4) confirment cette prédiction et attribuent au métabolite 2 la structure du 1,2,3,4-tétrahydro-1,2,3,4-tétrahydroxy-DBF (1,2,3,4-tétrol). Quand à la configuration de ce tétrol, nous possédons à son sujet très peu d'informations. En effet, les études de RMN n'ont pu apporter des renseignements exacts que sur les groupements

hydroxyles 3 et 4, lesquels adoptent des conformations équatoriales.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.1	7.26	6.24	4.53	4.94	8.29	8.11	7.38	7.38	8.01	7.45	6.34	4.48	4.48	8.32
met.2	5.68	4.42	4.26	5.04	8.43	8.15	7.5	7.5	8.50	8.86	7.7	7.7	8.27	8.97
met.3	7.50	6.35	4.61	5.05	8.44	7.63	-	6.99	8.30	8.75	7.6	7.6	8.24	8.79

TABLE III-4 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.1 : 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol ; met.2 : 1,2,3,4-tétrol ; met.3 : 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol).

C) Particularités du métabolisme du 3,4-dihydrodiol

Outre la particularité de se convertir en catéchol, le 3,4-dihydrodiol est métabolisé en trois principaux métabolites : le 1,2,3,4-tétrol, le 12,13-dihydrodiol-3,4-dihydrodiol et le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol. Les analyses quantitatives effectuées en utilisant des coefficients d'extinction analogues à celui du 3,4-dihydrodiol, donnent respectivement pour ces trois composés les valeurs 2 ug, 3 ug et 3 µg (il s'agit de quantités métaboliques issues de l'incubation de 85 ug de 3,4-dihydrodion en présence de 30 mg de protéines microsomales).

Comme nous le constatons, l'époxydation vicinale de la liaison éthylénique du 3,4-dihydrodiol ne constitue pas une réaction prédominante. Elle est associée à deux autres oxydations portant sur les deux noyaux benzéniques D et E. Notons qu'il y a une forte analogie entre le métabolisme du DBF (Chapitre II) et celui du 3,4-dihydrodiol. En effet, dans les deux cas, nous avons affaire aux mêmes sites préférentiellement oxydés par les monooxygénases (liaisons 3-4, 12-13 et 6-7 pour le DBF. Liaisons 12-13 et 6-7 pour le 3,4-dihydrodiol). Il faut noter aussi que les deux liaisons 8-9 et 10-11, qui étaient très peu réactives lors de la métabolisation du DBF, manifestent le même comportement métabolique avec le 3,4-dihydrodiol.

On est donc tenté d'admettre que dans les deux cas, l'évolution métabolique du DBF ou du 3,4-dihydrodiol n'est pas essentiellement régie par les considérations électroniques (indices de liaison), mais également par d'autres facteurs qui ont tendance à privilégier l'attaque enzymatique des mêmes sites moléculaires du DBF ou du 3,4-dihydrodiol.

A la lumière des données expérimentales exposées dans ce Chapitre et le Chapitre précédent, nous constatons néanmoins que le comportement métabolique de la liaison 1-2 est très différent selon qu'elle appartient au DBF ou au 3,4-dihydrodiol. En effet, lors de l'étude métabolique du DBF rapportée au

Chapitre II, le 1,2-dihydrodiol est apparu très minoritaire, tandis que le 1,2,3,4-tétrol produit par le métabolisme du 3,4-dihydrodiol constitue l'un des principaux composés métaboliques. Cet accroissement de la réactivité de la liaison 1-2 doit être attribué au caractère éthylénique du site attaqué. Cela laisse donc supposer que même si la répartition électronique au sein de la molécule (indices de liaison) ne semble pas constituer le facteur déterminant dans l'évolution métabolique, elle peut néanmoins influencer dans un sens ou dans un autre, la probabilité des réactions enzymatiques.

IV - Métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol

La manière dont le 7-hydroxy-DBF est métabolisé par les monooxygénases microsomales (Chapitre II) peut expliquer pourquoi cet hydrocarbure est dépourvu de tout pouvoir mutagène ainsi que tumoral. Il convient en effet, de rappeler que parmi les deux dihydrodiols susceptibles de subir l'époxydation vicinale selon la théorie de la "région baie", seul le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol a été détecté parmi les métabolites du 7-hydroxy-DBF et que la quantité de dihydrodiol apparue au cours de l'incubation microsomale est très faible. Elle ne constitue en effet qu'environ le cinquième de celle observée pour le DBF non substitué. Nous pouvons aussi considérer l'absence de pouvoir cancérogène du 7-hydroxy-DBF comme un phénomène résultant de l'incapacité totale ou partielle des enzymes, de convertir le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol en époxyde vicinal. Cette hypothèse nous conduit donc à étudier le métabolisme de ce dihydrodiol pour rechercher l'éventuelle apparition d'une voie métabolique aboutissant au 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol dont le précurseur serait le diol-époxyde de la région baie.

A) Conditions opératoires

L'incubation microsomale du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol a été effectuée en présence des microsomes hépatiques de rat, dans des conditions analogues à celle ayant servi à l'étude du métabolisme du 3,4-dihydrodiol. Cela confère l'avantage de permettre une comparaison quantitative de l'époxydation vicinale de chacun des deux substrats.

L'isolement et la séparation en HPLC de l'ensemble des métabolites formés ont été réalisés comme précédemment.

B) Structure des métabolites

Le profil d'élution en HPLC des métabolites du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol est présenté sur la Fig. III.7. L'excès du substrat n'ayant pas réagi au cours de l'incubation microsomale est élué, comme prévu, en 45 minutes.

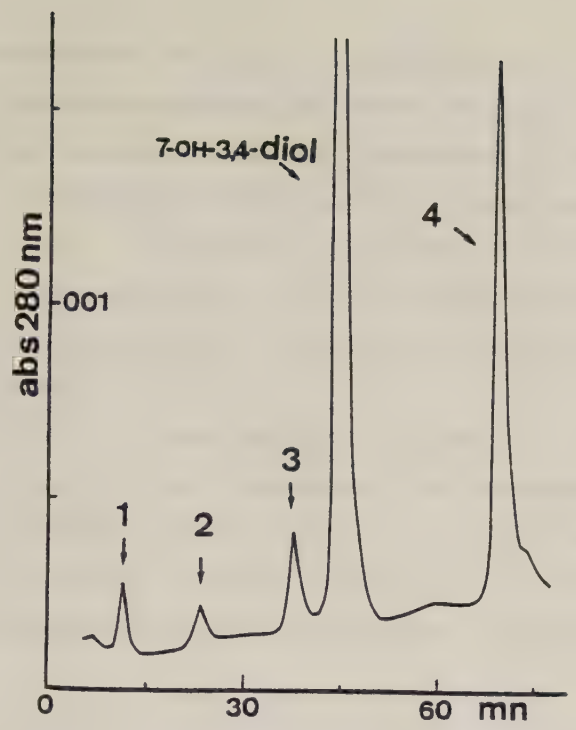


FIG. III-7 : Séparation en HPLC des métabolites du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol (microsomes hépatiques de rat).

L'examen rapide de ce diagramme permet deux remarques. La première est que le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol est très faiblement métabolisé et que la quantité de produit apparue est nettement moins importante que celle qui résulte du métabolisme du dihydrodiol non substitué (paragraphe III). La deuxième porte sur le comportement chromatographique du principal métabolite formé qui correspond au pic 4. Celui-ci en effet, se trouve dans une situation analogue à celle du 3,4-diphénol, dans la mesure où les deux composés sont élués en fin du chromatogramme, c'est-à-dire nettement après les hydrocarbures dont ils dérivent.

Le métabolite 4 possède une structure qui, outre cette caractéristique chromatographique, présente des propriétés spectrales de fluorescence très semblables à celles du 3,4-diphénol. Par ailleurs, il est comme celui-ci, instable et se transforme très facilement en précipité noirâtre. La structure la plus vraisemblable du métabolite 4 est donc celle d'un catéchol hydroxylé, à savoir le 3,4,7-triphénol-DBF. La conversion de la fonction dihydrodiol en catéchol semble donc concerner principalement la liaison 3,4. Elle n'est pas particulièrement affectée par la présence du groupement hydroxyl en position 7 puisque le 3,4-diphénol et le 3,4,7-triphénol semblent se former, avec des rendements comparables, à partir de chacun des composés parents.

Par contre, et c'est ce qu'illustre bien la Fig. III.7, l'apparition des composés polaires est très inhibée par l'introduction du groupement hydroxyl en position 7 du 3,4-dihydrodiol. Toutefois, nous constatons la formation de trois métabolites mineurs correspondant aux pics 1, 2 et 3. Les composés 2 et 3 sont

dépourvus de toute fluorescence à 77°K. Ils ont des comportements chromatographiques incompatibles avec des structures moléculaires comportant une deuxième fonction dihydrodiol. Il pourrait s'agir de composés issus d'une hydroxylation portant sur le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol.

Quant au métabolite 1, il montre une faible fluorescence dans l'éthanol absolu, détectable à 77°K. L'élucidation de sa structure s'est révélée difficile, du fait de la quantité très faible de produit formé rendant impossible l'emploi de la RMN.

Nous avons pu, cependant, surmonter cette difficulté en utilisant un autre procédé permettant de déterminer indirectement la structure de ce métabolite. Pour ce faire, nous avons incubé le 1,2,3,4-tétrol. Sur la Fig. III.8, nous comparons le profil d'élution de l'ensemble de métabolites qui est résultent (diagramme en traits discontinus) à celui précédemment étudié.

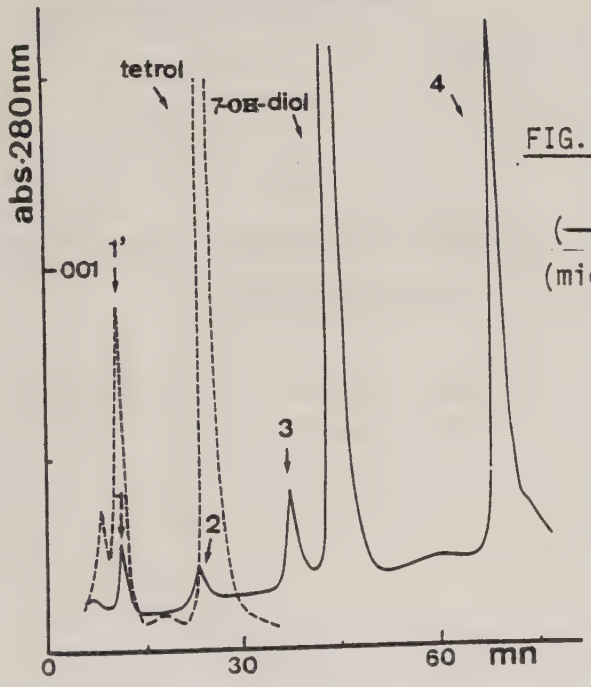


FIG. III-8 : Séparations en HPLC des métabolites du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol (——) et des métabolites du 1,2,3,4-tetrol (---) (microsomes hépatiques de rat).

Nous constatons que le principal métabolite formé au cours de l'incubation du 1,2,3,4-tétrol correspond au pic 1. Celui-ci se coélue parfaitement avec le métabolite 1. En outre, les spectres de fluorescence et de l'excitation de la fluorescence du composé 1' enregistrés dans l'éthanol absolu et à 77°K coincident exactement en position avec ceux du métabolite 1 (Fig. III.9a et Fig. III.9b).

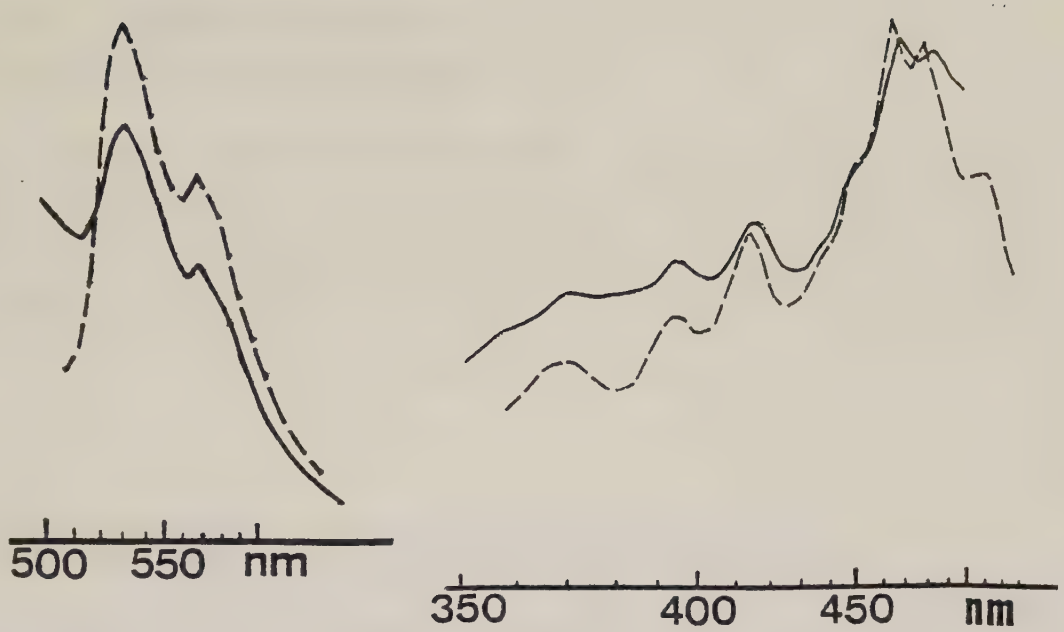


FIG. III-9b. – Spectres d'excitation de la fluorescence (77°K, éthanol absolu) du mét. 1 (——) et du mét. 1' (----).

FIG. III-9a. – Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du mét. 1 (——) et du mét. 1' (----)

Ces propriétés chromatographiques et spectrales permettent ainsi de montrer sans ambiguité que les composés 1 et 1' sont identiques. Il s'agit d'une structure moléculaire commune aux métabolismes du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol et du 1,2,3,4-tétrol qui s'identifie donc facilement comme étant le 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol. Cette structure a été confirmée par les études RMN effectuées sur le métabolite 1'. Celui-ci se formait en effet avec un rendement cinq fois plus

important que celui du métabolite 1. Il devenait possible, dans ces conditions, d'enregistrer les spectres de RMN. Dans le Tableau III.5, nous avons porté les déplacements chimiques observés des analyses spectrales. Leur interprétation permet d'attribuer effectivement au métabolite 1' (donc au métabolite 1) la structure du 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.1'						8.32	7.6	-	8.3	8.75	7.7	7.7	8.20	8.82

TABLE III-5 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.1' : 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol)

C) Particularités du métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol

La réaction enzymatique principale dont le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol est le siège, est celle qui aboutit à la transformation de la fonction dihydrodiol en une fonction catéchol. Celle-ci semble s'effectuer avec une efficacité comparable à celle de la formation du diphénol 3,4-DBF à partir du 3,4-dihydrodiol. Le groupement hydroxyle en 7 ne présente donc aucun effet apparent sur la vitesse de cette réaction enzymatique.

Cette étude montre aussi la possibilité d'obtenir enzymatiquement, à partir du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol, des intermédiaires métaboliques répondant à la théorie de la région baie, puisque nous avons détecté la présence du 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol. Cependant, cette époxydation vicinale se produit avec un rendement très faible. Une comparaison quantitative basée sur les hauteurs et sur les largeurs des pics chromatographiques, montre que le 1,2,3,4-tétrol formé directement à partir du 3,4-dihydrodiol est environ dix fois plus abondant que le tétrol substitué en position 7 provenant du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol.

Ainsi, le groupement hydroxyle substitué en position 7 du DBF intervient en empêchant qualitativement ou quantitativement la formation de dihydrodiols précurseurs d'époxydes vicinaux de région baie et il intervient également en limitant fortement la formation secondaire de ces époxydes.

En nous plaçant dans le cadre de la théorie de la région baie, il est donc possible d'interpréter l'absence des pouvoirs mutagène et tumoral du 7-hydroxy-DBF par les effets du groupements hydroxyle sur le métabolisme primaire, comme sur le rendement de l'époxydation vicinale.

Une des caractéristiques du métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol est l'absence de tout métabolite éluable avant le 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol (pic 1).

La formation de groupements dihydrodiols portés par les liaisons 10-11 ou 12-13 ne peut donc être envisagée dans le métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol dans la mesure où de tels métabolites seraient plus polaires que le produit 1 et seraient donc élués avant lui.

Une telle sélectivité métabolique épargnant le cycle D, au cours des réactions oxydatives peut paraître surprenante. Toutefois, elle est facilement interprétée si on la compare à celle du métabolisme du 7-hydroxy-DBF (caractérisé par l'absence du dihydrodiol porté par la liaison 12-13) et du 3,4-dihydrodiol (caractérisé par l'absence du dihydrodiol porté par la liaison 10-11). Cela revient pour le métabolisme du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol à additionner les contraintes imposées séparément par les deux groupements fonctionnels. Cependant, selon ces critères, l'époxydation vicinale du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol ne pourrait avoir lieu du fait de la présence du groupement hydroxyle dans le substrat (lequel a empêché la formation du 1,2-dihydrodiol à partir du 7-hydroxy-DBF). Néanmoins, nous ne devons pas perdre de vue, que cette époxydation vicinale est aussi régie par le caractère éthylénique de la liaison 1-2 qui, favorise cette réaction. Dans ces conditions, la formation métabolique d'une très faible quantité de 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrol à partir du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol, peut être considérée comme résultant d'un compromis entre deux facteurs antagonistes : la présence du groupement hydroxyle qui tend à empêcher cette formation, et le fort indice de liaison éthylénique qui tend à la favoriser.

V - Métabolisme du 12,13-dihydrodiol

L'ensemble des métabolites issus de l'incubation microsomale de 80 µg de 12,13-dihydrodiol a été soumis à une séparation chromatographique effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Le profil d'élution ainsi obtenu est présenté sur la Fig. III.10. Contrairement à ce qui a été observé lors que la métabolisation du 3,4-dihydrodiol, aucun métabolite majeur n'apparaît en fin du chromatogramme. Autrement dit, tous les produits du métabolisme du 12,13-dihydrodiol sont élués avant l'hydrocarbure dont ils dérivent et sont donc plus polaires.

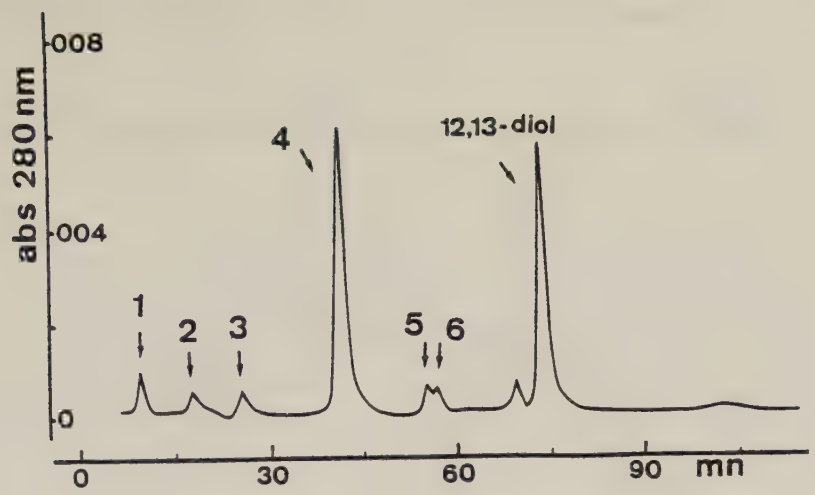


FIG. III-10 : Séparation en HPLC des métabolites du 12,13-dihydrodiol (microsomes hépatiques de rat).

A) Métabolisme total

Un dosage spectrophotométrique de la quantité du dihydrodiol non transformée, c'est-à-dire celle qui est contenue dans la fraction collectée au cours de la séparation chromatographique illustrée sur la Fig. III.10, montre que celle-ci est constituée de 7,5 µg. Il en résulte que sur les 80 µg de dihydrodiol initialement incubés, 72,5 µg ont été transformés par les enzymes microsomales, ce qui représente 90 % du substrat initial. Une forte activité métabolique est ainsi manifestée par les enzymes associées aux microsomes hépatiques de rat, vis-à-vis du 12,13-dihydrodiol. Celui-ci est nettement plus métabolisé que ne l'est le 3,4-dihydrodiol, dont 74 % seulement sont transformés par les enzymes microsomales.

B) Structures des métabolites

L'examen du diagramme de la Fig. III.10, montre l'existence d'au moins six principaux métabolites formés lors de l'incubation du 12,13-dihydrodiol. Le composé associé au pic 4 est de loin le plus important quantitativement, dans la mesure où il constitue, à lui seul, plus que la moitié de l'ensemble des métabolites.

a) Propriétés spectrales de la fluorescence

Selon les caractéristiques spectrales obtenues dans l'éthanol absolu à 77°K, nous avons pu classer les six métabolites en trois groupes. Le premier est constitué par le composé 2 dont les spectres de fluorescence (Fig. III.11) et d'excitation de la fluorescence sont identiques à ceux du 3,4-

dihydrodiol-12,13-dihydrodiol obtenu par le métabolisme du 3,4-dihydrodiol.

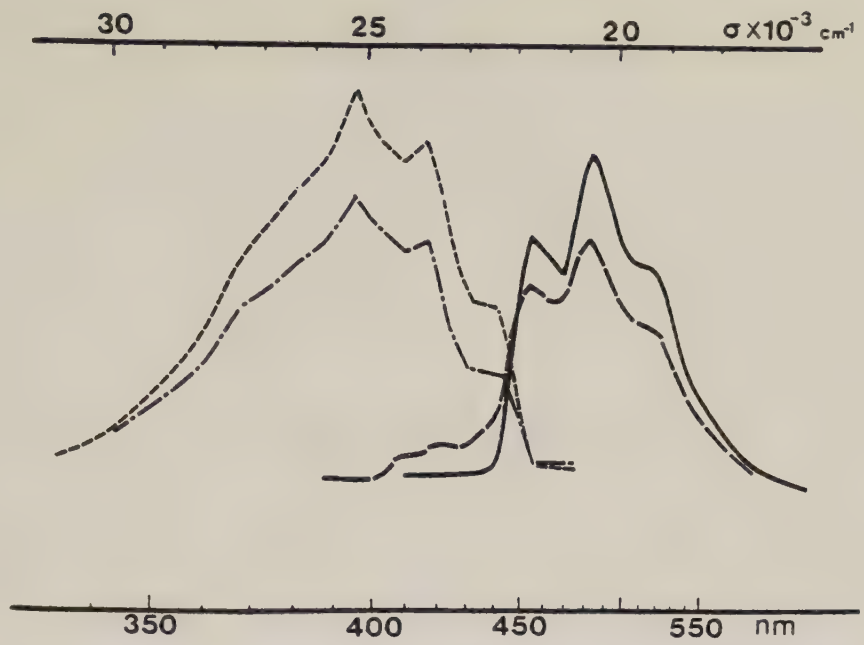


FIG. III-11 : Spectres de luminescence (77°K, éthanol absolu). Fluorescence du 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol (——). Fluorescence du met.2 (---). Spectre d'excitation du 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol (···). Spectre d'excitation du met.2 (·—·—).

Outre l'identité des spectres de luminescence, ces deux composés présentent les mêmes comportements chromatographiques. Nous pouvons ainsi aisément constater qu'il s'agit de la même structure moléculaire. Il existe donc deux voies enzymatiques distinctes aboutissant au 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol, empruntant chacune un des deux trans-EE-dihydrodiols formés.

Toutefois, le composé 2 semble se coéluer avec une impureté détectée par sa fluorescence dont le spectre, comme l'indique la Fig. III.11 est décalé vers les courtes longueurs d'onde par rapport à celui du 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol.

Dans le deuxième groupe métabolique, nous trouvons les trois composés associés aux pics 4,5 et 6. Leurs spectres de fluorescence (Fig. III.12a) ainsi que ceux de l'excitation de la fluorescence (Fig. III.12b) sont parfaitement semblables. Ils sont très comparables aux spectres du 12,13-dihydrodiol, avec toutefois un léger déplacement bathochrome par rapport à ceux-ci. Ces caractéristiques spectrales issues des trois métabolites 4,5 et 6 sont très compatibles avec des structures phénoliques dans lesquelles un des hydrogènes de la molécule du dihydrodiol serait substitué par un groupement hydroxyle.

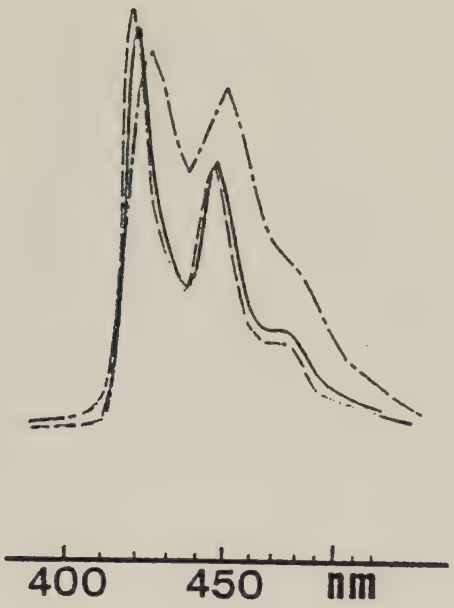


FIG. III-12a. — Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du mét. 4 (——), du mét. 5 (----) et du mét. 6 (- -).

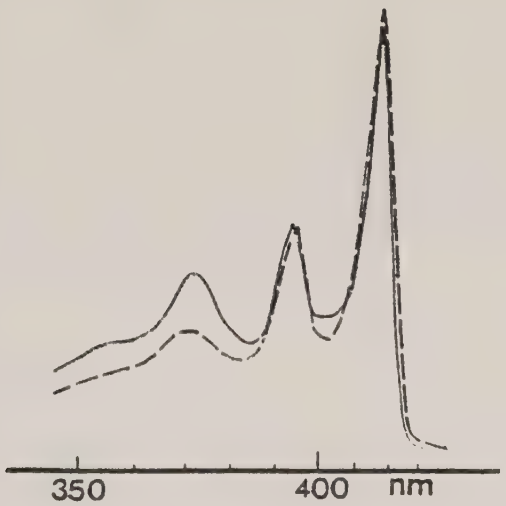


FIG. III-12b. — Spectres d'excitation de la fluorescence (77°K, éthanol absolu) du mét. 4 (——) et du mét. 5 (----).

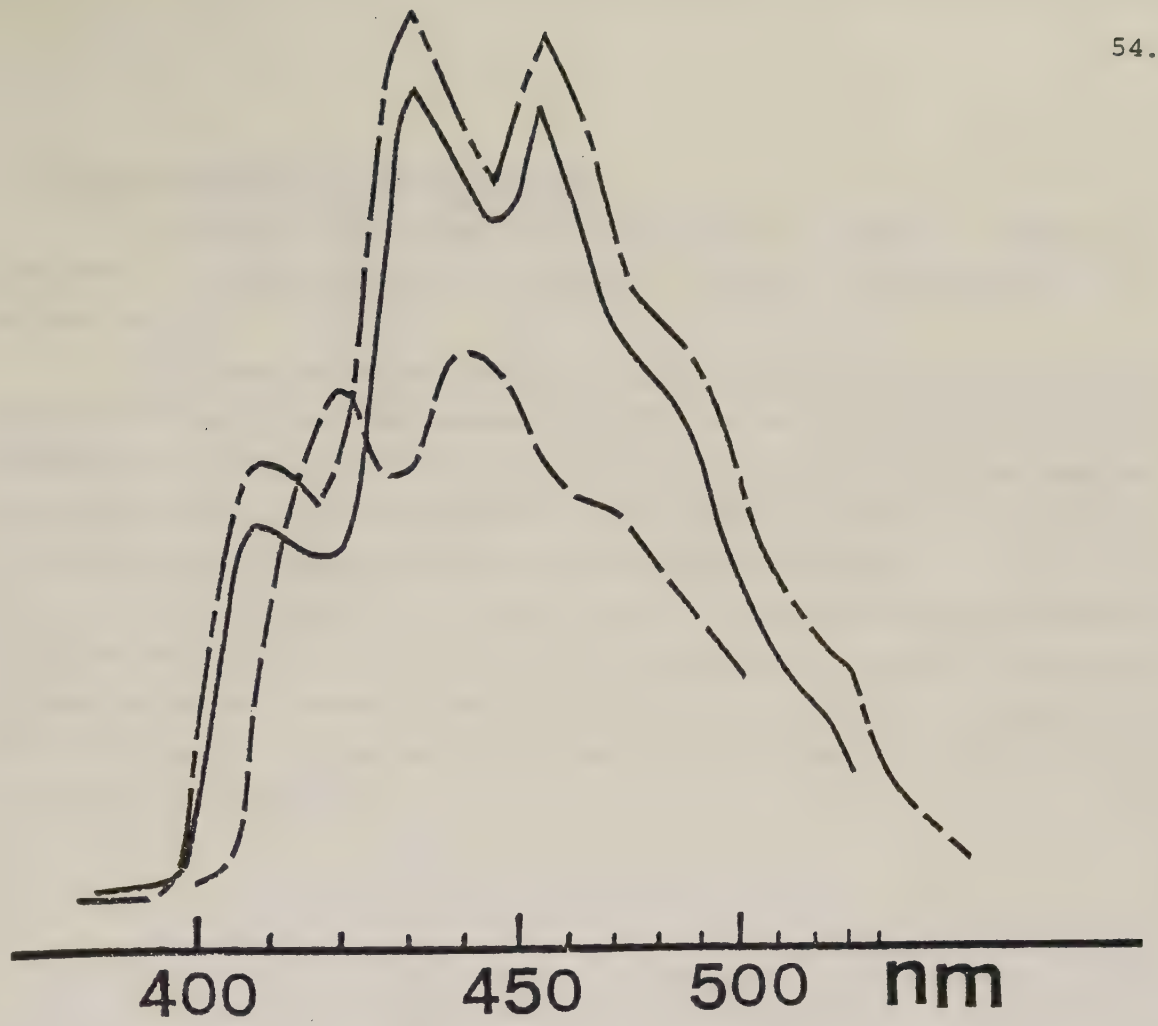


FIG. III-13. – Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du mét. 1 (----), du mét. 3 (- —— -) et du 10,11,12,13-tétrahydro-DBF (——).

Le troisième groupe est celui qui est formé par les deux métabolites 1 et 3. Leurs spectres de fluorescence se comparent en position de bandes et en structure vibrationnelle à celui du 10,11,12,13-tétrahydro-DBF (Fig. III.13). Les métabolites 1 et 3 doivent donc avoir deux structures moléculaires issues de la réduction de la double liaison éthylénique, 10-11.

b) Identification des structures par RMN

Le spectre RMN enregistré à partir du pic 2, a permis de confirmer la structure du 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol attribuée précédemment à ce métabolite.

Le composé métabolique majoritaire associé au pic 4 aboutit à un spectre RMN qui présente un système ABC dont les couplages sélectifs ont été attribués aux protons H-1, H-2 et H-4 (Fig. III.14 et Table III.6). Ces résultats s'interprètent facilement en conférant à ce métabolite la structure du 3-hydroxy-12,13-dihydro-12,13-dihydroxy-DBF (3-hydroxy-12,13-dihydrodiol).

Dans le Tableau III.6, nous avons porté également les déplacements chimiques correspondant au spectre RMN du métabolite 5. Ce spectre montre que la substitution dont résulte le produit 5 porte sur le proton 2. Ce métabolite correspond donc à la structure du 2-hydroxy-12,13-dihydro-12,13-dihydroxy-DBF (2-hydroxy-12,13-dihydrodiol).

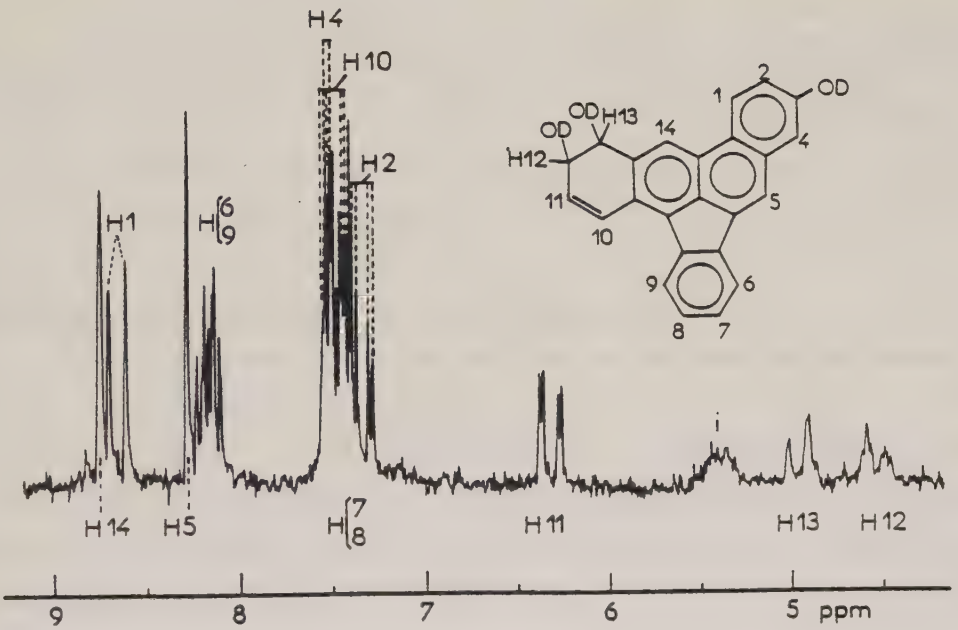


FIG. III-14. — Spectre RMN du met. 4 : 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.4	8.64	7.34	-	7.52	8.27	8.15	7.45	7.45	8.15	7.48	6.32	4.54	4.97	8.73
met.5	8.14	-	7.26	8.01	8.32	8.15	7.40	7.40	8.15	7.51	6.35			8.72

TABLE III-6 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.4 : 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol ; met.5 : 2-hydroxy-12,13-dihydrodiol

Le spectre RMN du métabolite 6 est compatible avec une structure dans laquelle est présent un substituant hydroxylé. Toutefois, la position de cette substitution n'a pu être localisée avec certitude. Elle semble, en tout cas, porter sur le noyau A de la molécule, c'est-à-dire sur les carbones 1 ou 4.

Les deux métabolites 1 et 3 sont caractérisés par des spectres RMN dépourvus des résonances situées dans le domaine des champs moyens suggérant la disparition de la liaison éthylénique de la molécule parente. Les déplacements chimiques, portées dans le Tableau III.7, confirment cette prédiction en attribuant aux métabolites 3 et 1 les structures respectives du 10,11,12,13-tétrahydro-10,11,12,13-tétrahydroxy-DBF (10,11,12,13-tétrol) et du 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrahydro-10,11,12,13-tétrahydroxy-DBF (3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol). Il s'agit donc de deux produits issus de l'époxydation vicinale du 12,13-dihydrodiol.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
met.1	8.64	7.32			8.25									8.77
met.3	8.65	7.7	7.7	8.07	8.39	x	7.46	7.46	x	5.34	4.68	4.19	5.10	8.88

TABLE III-7 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.1 : 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol ; met.3 : 10,11,12,13-tétrol) x : centré à 8.07 ppm)

C) Origine métabolique du 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol

Il s'agit d'un métabolite tertiaire issu de trois oxydations successives du DBF et qui peut, théoriquement, résulter de l'époxydation vicinale du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol, mais il peut également provenir de l'hydroxylation au niveau du carbone 3 du 10,11,12,13-tétrol. Les deux précurseurs éventuels proviennent du métabolisme du 12,13-dihydrodiol. Seule l'étude métabolique de chacun des deux composés pourrait permettre de trancher entre les deux séquences enzymatiques envisagées.

Pour ce faire, nous avons effectué deux expériences au cours desquelles le 10,11,12,13-tétrol et le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol ont été incubés séparément durant 25 minutes en présence des microsomes hépatiques de rat (pour chaque incubation nous avons utilisé comme précédemment, 3 ml d'une suspension microsomale contenant 10 mg de protéine par ml). L'isolement et la séparation chromatographique des métabolites formés, s'effectuent dans les mêmes conditions décrites précédemment.

Les deux profils d'élution enregistrés sont présentés sur la Fig. III.15. Nous pouvons constater aisément que le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol est très faiblement métabolisé (diagramme en traits discontinus). Par contre, le 10,11,12,13-

tétrol a subi une métabolisation intense dont les principaux produits issus correspondent aux pics 1 et 2 (diagramme en trait continu).

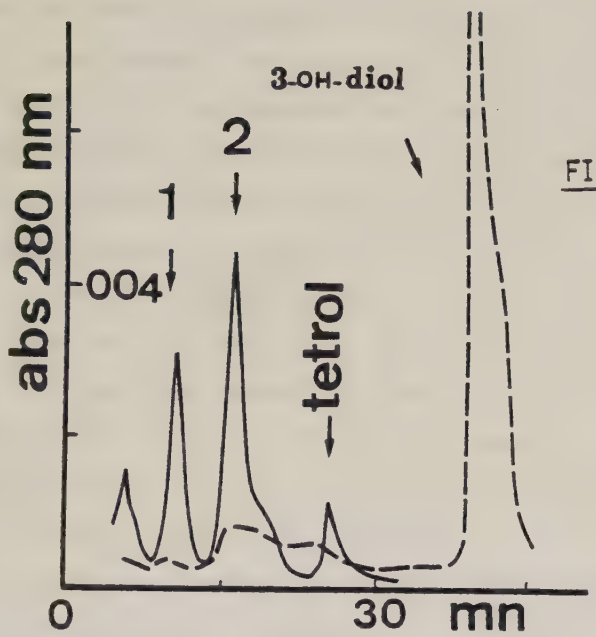


FIG. III-15. – Séparations en HPLC des métabolites du 10,11,12-13-tétrol (——) et des métabolites du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (----) (microsomes hépatiques de rat)

Le métabolite 2 donne des spectres de luminescence semblables à ceux de l'hydrocarbure parent. Son spectre de RMN, enregistré dans l'acétone deutériée et les déplacements chimiques déduits des analyses spectrales (Table III.8) ont permis facilement de lui attribuer la structure du 2-hydroxy-10,11,12,13-tétrol.

Protons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Met.2	8.12	-	7.23	7.97	8.27	8.05	7.40	7.40	8.25	5.54	4.40	4.26	5.10	8.76

TABLE III-8 : Déplacements chimiques (ppm) relatifs au tétraméthylsilane (met.2 : 2-hydroxy-12,13-dihydrodiol)

Les études effectuées sur le métabolite 1 ont montré qu'il s'agit d'un composé dont les spectres de luminescence et de RMN, ainsi que le comportement chromatographique, sont identiques à ceux du 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol.

Il devient clair, à partir de ces expériences, que le 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol produit par l'incubation microsomale du 12,13-dihydrodiol, résulte de la remétabolisation du 10,11,12,13-tétrol et non de l'époxydation vicinale du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent, que le métabolite

correspondant au pic 2 de la Fig. III.10, c'est-à-dire le 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol n'était pas pur. En effet, une très faible proportion d'une impureté est coéluée avec ce composé qui se caractérise par un spectre de fluorescence décalé vers les courtes longueurs d'onde (Fig. III.11). Il s'est avéré que cette fluorescence est très voisine de celle du 2-hydroxy-10,11,12,13-tétrol. Une très faible quantité de ce composé est donc susceptible d'être formée au cours de l'incubation microsomale du 12,13-dihydrodiol. Celle-ci, bien qu'elle ait conduit à la formation d'une proportion relativement importante de 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol, ne produirait que des traces de 2-hydroxy-10,11,12,13-tétrol, contrastant ainsi avec l'incubation du 10,11,12,13-tétrol, dont les deux composés hydroxylés formés étaient majoritaires. Il est vraisemblable que ce comportement métabolique est lié au fait que les vitesses de formation du 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol et du 2-hydroxy-10,11,12,13-tétrol ne répondent pas à des cinétiques enzymatiques similaires. Nous avons constaté, en effet, que pour des concentrations élevées de 10,11,12,13-tétrol, la formation du 2-hydroxy-10,11,12,13-tétrol devient prédominante tandis que le 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol constitue le principal métabolite quand l'incubation s'effectue à partir de faibles concentrations de 10,11,12,13-tétrol. Or, durant l'incubation microsomale du 12,13-dihydrodiol, la formation métabolique du tétrol n'est pas importante et, de ce fait, la concentration en ce produit reste faible. Dans ces conditions, le 10,11,12,13-tétrol serait converti préférentiellement en 3-hydroxy-10,11,12,12-tétrol.

C) Particularités du métabolisme du 12,13-dihydrodiol

Ces nombreuses données expérimentales permettent de déduire certaines caractéristiques du métabolisme du 12,13-dihydrodiol. L'époxydation vicinale doit naturellement faire l'objet d'une attention particulière de notre part. Elle est associée aux métabolites 1 et 3 de la Fig. III.10, c'est-à-dire au 10,11,12,13-tétrol et au 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol. Par dosage spectrophotométrique faisant intervenir le même coefficient d'extinction, celui du 12,13-dihydrodiol (74 000 M^{-1} cm^{-1} pour = 300 nm), nous avons pu déterminer approximativement la quantité totale du produit issu de cette époxydation vicinale. Elle correspond à 1,5 ug.

L'enseignement que nous pouvons tirer de cette valeur est que la nature éthylénique de la liaison 10-11 semble favoriser l'époxydation vicinale du 12,13-dihydrodiol, dans la mesure où cette même liaison est difficilement oxydée au cours de la métabolisation primaire du DBF.

Toutefois, cette époxydation vicinale ne constitue qu'une faible partie du métabolisme. Celui-ci est caractérisé par l'oxydation préférentielle de la liaison 3-4, dont les principaux produits sont le 12,13-dihydrodiol-3,4-dihydrodiol et

surtout le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol dont il est produit 9 ug environ.

Ce n'est donc pas la répartition électronique au sein du 12,13-dihydrodiol (indices de liaison) qui paraît constituer le principal facteur régissant l'évolution métabolique.

Un autre point caractéristique méritant une mention particulière est que la formation du dérivé métabolique hydroxylé en position 7, n'a pu avoir lieu à partir du 12,13-dihydrodiol. Les études métaboliques présentées dans le Chapitre II nous ont révélé que l'hydroxylation du DBF en position 7 a empêché sélectivement la formation d'un dihydrodiol au niveau de la liaison 12-13.

Il apparaît ainsi une sorte d'interdépendance entre les deux sites 12-13 et 6-7 (ou le carbone 7) ; chacun de ces deux sites ne peut subir l'action des monooxygénases que si l'autre est intact.

CHAPITRE IV

Etude métabolique comparative (rats - souris)

I - GENERALITES

A) Introduction

Si le pouvoir cancérogène d'un hydrocarbure aromatique polycyclique s'exprime chez une espèce animale, c'est que celle-ci dispose au niveau cellulaire d'un équipement enzymatique capable d'activer métaboliquement cette substance chimique.

Nous avons vu que cet équipement enzymatique est essentiellement localisé dans les membranes du reticulum endoplasmique des cellules hépatiques et qu'il fait intervenir un ensemble de cytochromes P-450 dont la composition qualitative et quantitative dépend de l'espèce animale ainsi que du traitement inducteur subi.

Les études métaboliques développées dans les deux chapitres précédents ont révélé que les microsomes hépatiques des rats traités au 3-méthylcolanthrène (3-MC) disposent d'une activité catalytique susceptible de transformer le dibenzo(a,e)fluoranthène (DBF) en trois intermédiaires métaboliques qui, selon la théorie de la région baie, pourraient constituer des formes ultimes.

Il faut préciser d'emblée qu'il n'y a à priori aucune raison pour que les différentes formes enzymatiques présentes dans les microsomes de rats, soient identiques à celles qui constituent un système microsomal appartenant à une autre espèce animale.

La souris, par exemple, est-elle capable d'activer le DBF selon des voies enzymatiques analogues à celles observées chez le rat ?

Avant d'aborder cette comparaison métabolique, nous exposerons dans le paragraphe qui suit l'état actuel de nos connaissances sur la constitution enzymatique des deux systèmes microsomaux hépatiques du rat et de la souris.

B) Equipements enzymatiques

a) Chez la souris (induction 3-MC)

Le locus Ah de la souris détermine l'expression de plusieurs activités enzymatiques. Il comporte, en effet, des gènes de structure qui sont associés à l'induction par des composés aromatiques polycycliques de la NAD(P):ménadione oxydoréductase (10), de l'UDP-glucuronosyltransférase (11), de l'ornithine

décarboxylase (12) et de plusieurs cytochromes P-450 (92).

L'expression de ces gènes semble être sous le contrôle d'un gène régulateur qui commande la synthèse d'une protéine cytosolique (récepteur), laquelle a une affinité pour l'inducteur. Il est admis actuellement que la formation du complexe inducteur-récepteur est une étape nécessaire au déclenchement du processus de l'induction par le 3-méthylcolanthrène (95,13). Ainsi, par exemple, l'absence du récepteur constatée chez certaines souches de souris (DBA/2) entraînerait l'impossibilité d'induire par le 3-méthylcolanthrène la synthèse de nouvelles enzymes (14,15). On peut cependant constater que la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) est par exemple capable de sensibiliser les souris DBA/2 et d'induire une synthèse enzymatique identique à celle induite par le 3-méthylcolanthrène chez les souches sensibles (95). Cela semble donc montrer que les souches DBA/2 portent une mutation au locus Ah qui réside au niveau du gène régulateur codant pour la protéine cytosolique et non au niveau des gènes de structure des monooxygénases.

Les études réalisées par Nebert et ses collaborateurs (93,94,104,105) ont permis l'isolement et la purification de deux cytochromes P-450 hépatiques qui résultent de l'induction par le 3-méthylcolanthrène des souris appartenant à des souches sensibles. Il s'agit de deux enzymes de poids moléculaire voisin de 55 000 daltons mais qui se distinguent par leurs propriétés spectroscopiques, à savoir que la fixation de l'oxyde de carbone sur les deux protéines préalablement réduites aboutit à la formation de deux complexes présentant une bande d'absorption de Soret caractéristique qui se situe à 448 nm pour l'un et à 449,3 nm pour l'autre (114). La nomenclature de ces deux enzymes, P-448 et P_1-450, découle de ces propriétés spectrales. On a constaté que les deux enzymes diffèrent aussi par leur structure primaire, leurs propriétés immunochimiques ainsi que par leur spécificité vis-à-vis des substrats métabolisés (93,94,104,105). La spécificité de P_1-450 concerne préférentiellement des substrats hydrophobes tels que le benzo(a)pyrène, par contre le P-448 est surtout capable de catalyser l'oxydation de substances relativement polaires comme l'acétanilide (93).

L'absence de l'inducteur n'empêche pas la cellule hépatique de la souris de synthétiser la forme P-448 dont le taux de synthèse est cependant multiplié par un facteur 5 à 12 à la suite de l'induction. En revanche, le P_1-450 est une enzyme qui ne se forme qu'en présence du 3-méthylcolanthrène (94).

Une caractéristique structurale s'ajouterait à toutes les propriétés que nous venons de mentionner. En effet, les études de marquage spécifiques effectuées par Nebert et coll. (94) semblent montrer que l'architecture microsomale est telle que la forme P-448 serait plus exposée à la surface membranaire tandis que la forme P_1-450 se situerait complètement à l'intérieur de la membrane et serait donc plus lipophile que P-448.

On peut constater la corrélation existant entre l'organisation membranaire de ces deux enzymes et leur spécificité vis-à-vis des substrats. En effet, les substances hydrophobes sont métabolisées préférentiellement par la forme enzymatique qui serait plus enfouie dans les lipides des microsomes.

b) Chez le rat

Du point de vue immunochimique, les anticorps préparés à partir des deux formes enzymatiques P-448 et P_1-450 provenant de la souris, semblent précipiter certains cytochromes P-450 présents dans le foie du rat (94). Il en résulte qu'une certaine similitude pourrait exister entre les deux systèmes enzymatiques.

Les travaux effectués par Ryan et coll. (109) ont aboutit à la purification et la caractérisation de trois formes de cytochromes P-450 à partir des microsomes hépatiques de rat. Il s'agit de $P\text{-}450_a$, $P\text{-}450_b$ et $P\text{-}450_c$ auxquels sont associés respectivement des poids moléculaires de 48 000, 52 000 et de 56 000. Les complexes avec l'oxyde de carbone réduits formés par ces trois enzymes présentent des bandes d'absorption de Soret qui se situent à 452 nm pour $P\text{-}450_a$ à 450 nm pour $P\text{-}450_b$ et à 447 nm pour $P\text{-}450_c$ (109).

$P\text{-}450_a$ et $P\text{-}450_b$ sont pratiquement incapables de métaboliser le benzo(a)pyrène. Ils interviennent, par contre, dans les hydroxylations de la testostérone, en position 7 et 16 respectivement. En outre, $P\text{-}450_b$ présente une forte activité catalytique en déméthylant la benzphétamine. Par ailleurs, le taux de synthèse de ces deux enzymes n'est pas affecté par le 3-méthylcholanthrène (130). On peut cependant induire $P\text{-}450_b$ par le phénobarbital (109,110).

Le 3-méthylcholanthrène induit principalement la synthèse de la forme $P\text{-}450_c$ (109,110,111). Cette enzyme présente une grande spécificité vis-à-vis des substrats apolaires tels que le benzo(a)pyrène (109). Nous avons déjà dit que les souris traitées préalablement au 3-méthylcholanthrène possèdent dans leur système microsomal, deux formes enzymatiques, P-448 et P_1-450 et que cette dernière métabolise préférentiellement le benzo(a)pyrène, c'est-à-dire des substrats hydrophobes. Il apparaît ainsi une certaine similitude du point de vue catalytique entre P_1450 et le $P\text{-}450_c$. De plus, ils possèdent pratiquement le même poids moléculaire. Toutefois, ces deux enzymes présentent des caractéristiques spectrales distinctes puisque la bande de Soret correspondant à P_1450 est située à 449,3 nm tandis que celle caractérisant $P\text{-}450_c$ se situe à 447 nm. Ainsi ces deux formes seraient vraisemblablement distinctes malgré leurs propriétés communes.

Ces études comparatives semblent ainsi indiquer que les deux systèmes enzymatiques microsomaux sont génétiquement différents ; aucune des deux formes

présentes chez la souris ne peut s'identifier à l'une des trois enzymes du microsome de rat. Cependant, on peut constater que le 3-méthylcholanthrène induit chez les deux espèces deux enzymes, P_1-450 et P-450$_c$ qui peuvent avoir beaucoup d'analogie, notamment en ce qui concerne la nature du substrat métabolisé.

Contrairement à ce que l'on pouvait penser, une étude plus détaillée par chromatographie à haute performance a révélé que la membrane microsomale des cellules hépatiques de rats est, en fait, formée de très nombreux cytochromes P-450 (131). On a pu détecter ainsi en plus des 3 formes majoritaires P-450$_a$, P-450$_b$ et P-450$_c$, au moins 9 autres hémoprotéines présentes en faibles quantités. Il ne faut pas perdre de vue dans ces conditions que ces enzymes aussi minoritaires soient elles, peuvent participer aux processus métaboliques dans la mesure où le facteur qui limite la vitesse des oxydations catalytiques n'est pas forcément l'oxydase terminale de la chaîne microsomale mais la NADPH-cytochrome P-450-réductase (16). Comme il est vraisemblable qu'un grand nombre d'enzymes minoritaires soient aussi présentes dans les microsomes hépatiques de la souris, on doit tenir compte de l'éventuelle participation de certaines de ces formes enzymatiques dans des processus métaboliques du DBF et de ses dérivés, en présence des deux systèmes microsomaux.

II - Comparaison métabolique

A) Métabolisme du DBF

Les deux systèmes enzymatiques utilisés pour l'étude du métabolisme du dibenzo(a,e)fluoranthène sont constitués respectivement de microsomes hépatiques de rats (Wistar) et de souris (lignée XVII nc/Z). Dans les deux cas, les animaux ont subi 48 heures avant d'être sacrifiés un traitement au 3-méthylcholanthrène par injection intrapéritonéale.

Chacune des deux incubations est constituée de 16,4 ml d'eau, volume auquel sont ajoutés successivement 2,1 ml d'une solution tamponnée de NADPH (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 0,03 M $MgCl_2$, 3,65 mM NADPH), 3 ml d'une suspension microsomale (0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M sucrose et contenant 10 mg de protéines par ml) et 300 µg de DBF dissous dans 150 µl d'acétone distillée.

Les deux échantillons sont incubés à 37°C pendant 35 minutes puis les métabolites formés et l'hydrocarbure non transformé sont extraits à l'acétate d'éthyle. Chacune des deux phases organiques ainsi obtenues est évaporée sous vide, puis reprises dans 0,85 ml d'une solution méthanolique (0,7 ml méthanol, 0,15 ml H_2O) qui sera soumise à la chromatographie HPLC.

La Fig. IV-1 compare les principaux métabolites du DBF obtenus dans les deux systèmes. Ils paraissent qualitativement et quantitativement très

semblables. Il y a cependant certaines différences quantitatives qui apparaissent au niveau des produits métaboliques majoritaires. Celles-ci, bien que mineures sont significatives dans la mesure où elles sont très reproductibles expérimentalement. Il apparaît ainsi que l'oxydation catalytique de la liaison 3-4 du DBF est favorisée par incubation en présence des microsomes hépatiques de souris. Cela est révélé par la simple comparaison des trois pics de la Fig. IV-1 correspondant au 3,4-dihydrodiol,3-hydroxy et 4-hydroxy-DBF.

Par contre, le système microsomal de rat montre une activité enzymatique plus favorable à l'obtention du 12,13-dihydrodiol et du 7-hydroxy-DBF. Il en va de même pour le 10,11-dihydrodiol, le 1,2-dihydrodiol ainsi que pour le pic C dont la structure est encore non élucidée (voir Chapitre I).

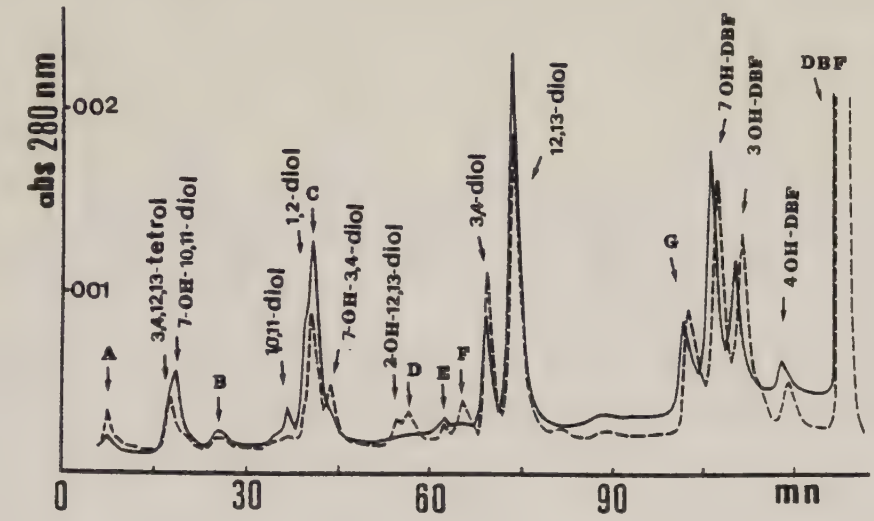


FIG. IV-1. — Séparations en HPLC des métabolites du DBF.
Microsomes hépatiques de rat (——) et microsomes hépatiques de souris (----).

Toutefois, c'est au niveau des métabolites secondaires, c'est-à-dire de ceux qui résultent d'une métabolisation des dihydrodiols et des phénols déjà formés, que nous avons constaté une différence très nette entre les deux profils d'élutions de la Fig. IV-1. Celle-ci montre, en effet, que les métabolites A, le 7-hydroxy-dihydrodiol, le 2-hydroxy-12,13-dihydrodiol, les métabolites D et F, qui étaient quasi inexistants chez le rat sont nettement observés chez la souris.

B) Métabolisme du 3,4-dihydrodiol

Nous avons effectué deux expériences analogues à celles décrites dans le sous paragraphe A en remplaçant le DBF par 85 µg de 3,4-dihydrodiol (dans 150 µl d'acétone) et en réduisant le temps d'incubation à 30 minutes. Après extraction à

l'acétate d'éthyle et évaporation à sec, les métabolites ainsi formés et le 3,4-dihydrodiol qui n'a pas réagi, sont repris par 0,85 ml (0,7 ml méthanol, 0,15 ml H_2O) et soumis à la chromatographie HPLC. La Fig. IV-2 illustre les profils d'élution de l'ensemble de ces métabolites formés en présence des microsomes de rats (chromatogramme continu) et de souris (chromatogramme discontinu).

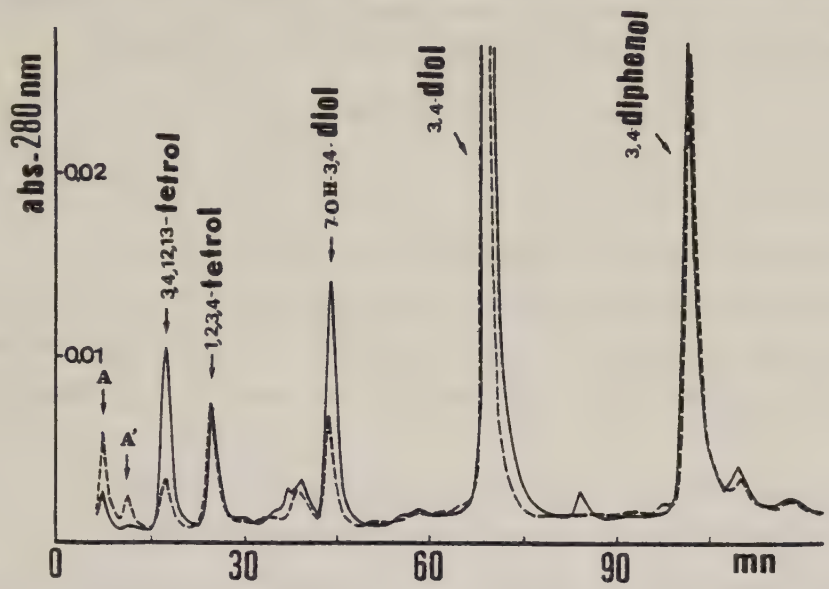


FIG. IV-2. — Séparations en HPLC des métabolites du 3,4-dihydrodiol. Microsomes hépatiques de rat (——) et microsomes hépatiques de souris (----).

La souris est donc capable de convertir le 3,4-dihydrodiol en divers composés qui par leurs temps de rétention (Fig. IV.2) et aussi par leurs caractéristiques spectrales (fluorescence, absorption, RMN) s'identifient à ceux obtenus en présence des microsomes de rats.

La distinction entre les deux systèmes enzymatiques n'est donc pas qualitative. Par contre, au niveau quantitatif, des différences catalytiques entre le rat et la souris apparaîssent.

L'efficacité avec laquelle s'effectue la métabolisation globale du 3,4-dihydrodiol peut être déterminée en soustrayant de la quantité de dihydrodiol incubée initialement celle récupérée en HPLC, c'est-à-dire non transformée par les enzymes microsomales. Nous avons pu montrer ainsi que l'activité métabolique est globalement plus importante chez la souris que chez le rat. En effet, comme l'indique la Table IV.1, 88 % du dihydrodiol a été métabolisé en présence de la fraction microsomale de la souris, tandis que le même système enzymatique appartenant au rat ne transforme que 74 % du même substrat.

Microsomes	3,4dihydrodiol incubé	3,4-dihydrodiol récupéré	3,4-dihydrodiol métabolisé	% métabolisé
Rat	85 µg	22 µg	63 µg	74
Souris	85 µg	10 µg	75 µg	88

TABLE IV-1 : Métabolisme total du 3,4-dihydrodiol

(comparaison : rat-souris)

Cette conclusion qui concerne l'activité enzymatique globale, contraste cependant avec l'aspect apparent des deux profils d'élution de la Fig. IV.2. En effet, un examen rapide de celle-ci permet de constater que la conversion du 3,4-dihydrodiol en composés métaboliques est particulièrement plus importante chez le rat que chez la souris.

Parmi les composés s'éluant entre 0 et 50 minutes, seuls les métabolites A et A' ont été favorisés par le système microsomal de la souris. Quant au métabolite ayant la structure du 1,2,3,4-tétrol, sa formation n'est pas affectée par le choix du système enzymatique.

En revanche, le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol et le 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol (3,4,12,13-tétrol) sont beaucoup moins produits quand l'incubation du 3,4-dihydrodiol s'effectue en présence des microsomes hépatiques de souris. C'est la propriété principale de ce système enzymatique par rapport à celui du rat.

La formation métabolique du 3,4-diphénol s'est révélée très fluctuante d'une incubation à l'autre. Comme nous l'avons signalé au Chapitre II, cela résulterait d'une instabilité de ce métabolite ; les produits qui en résultent seraient insolubles dans le méthanol donc non éluables en HPLC. Ce type de dégradation est donc incontrôlable, ce qui rend difficile l'évaluation réelle des intensités des pics correspondant à ces métabolites. Néanmoins, nous avons pu constater que, statistiquement, c'est le système microsomal de souris qui catalyse avec la plus grande efficacité la conversion du 3,4-dihydrodiol en 3,4-diphénol.

Quand nous effectuons des dosages approximatifs, basés sur des coefficients d'extinction de substances modèles ayant les mêmes structures aromatiques que celles des métabolites (voir Chapitre II), nous aboutissons à des valeurs concernant l'ensemble des produits élués dans les 50 premières minutes, qui se situent aux alentours de 8 ug pour les microsomes de rat et de 4 µg pour ceux de

la souris. Nous sommes donc très loin des quantités totales de dihydrodiol métabolisées respectivement par les deux systèmes enzymatiques, à savoir 63 µg et 75 µg. L'intensité apparente des pics correspondant au 3,4-diphénol ne peut suffir en elle-même à combler cette différence, dans la mesure où, en lui attribuant un coefficient d'extinction du même ordre que celui du DBF, ce métabolite se situerait quantitativement entre 5 et 10 µg. Il est possible que la conversion du 3,4-dihydrodiol en 3,4-diphénol soit plus efficace qu'il n'apparaît. L'intensité de ce produit et sa transformation en composés insolubles pourraient être responsables de la non équivalence de la quantité totale du dihydrodiol métabolisé et de celle des métabolites élués en HPLC. Cette hypothèse permet d'interpréter la différence métabolique observée entre le rat et la souris. Celle-ci métabolise le 3,4-dihydrodiol avec plus d'efficacité, mais en le convertissant préférentiellement en diphénol.

C) Incubation du 12,13-dihydrodiol

Les conditions dans lesquelles les deux incubations du 12,13-dihydrodiol ont été effectuées, sont similaires à celles décrites précédemment, avec toutefois une modification mineure de la quantité du substrat utilisé (80 µg au lieu de 85 ug).

Sur la Fig. IV.3 nous avons représenté les profils d'élution en HPLC des métabolites formés en présence de microsomes hépatiques de rats (diagramme continu) et de ceux de la souris (diagramme discontinu).

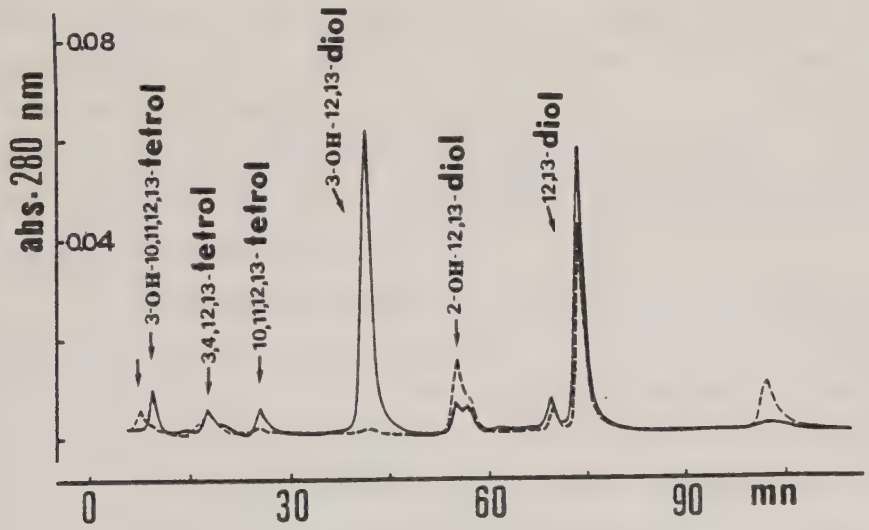


FIG. IV-3. — Séparation en HPLC des métabolites du 12,13-dihydrodiol. Microsomes hépatiques de rat (——) et microsomes hépatiques de souris (----).

Le dosage de la fraction non transformée du 12,13-dihydrodiol dans chacune des deux incubations montre que l'efficacité du métabolisme global de ce composé est légèrement plus importante chez la souris que chez le rat. La Table IV.2 indique, en effet, que 90 % et 93 % du substrat initial sont transformés selon que nous utilisons le système microsomal de rat ou celui de la souris.

Microsomes	12,13-dihydrodiol incubé	12,13-dihydrodiol récupéré	12,13-dihydrodiol métabolisé	% métabolisé
Rat	80 µg	7,5 µg	72,5 µg	90
Souris	80 µg	5,5 µg	74,5 µg	93

TABLE IV-2 : Métabolisme total du 12,13-dihydrodiol

(comparaison : rat-souris)

L'examen des deux profils d'élution de la Fig. IV.3 montre une différence très marquée entre les deux systèmes : le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol est quasi inexistant sur le chromatogramme discontinu. Les microsomes hépatiques de souris sont donc incapables de réaliser la conversion enzymatique aboutissant à la formation de ce métabolite qui, chez le rat, constitue pourtant le principal composé formé.

Outre l'impossibilité d'aboutir au 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol, les microsomes hépatiques de souris sont également incapables de former le 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol (Fig. IV.3). Il existe donc des différences très caractéristiques entre les activités enzymatiques des deux systèmes étudiés lors de l'incubation du 12,13-dihydrodiol.

A ces différences qualitatives s'en ajoutent d'autres simplement quantitatives. C'est le cas de la production de deux métabolites, le 10,11,12,13-tétrol et le 2-hydroxy-12,13-dihydrodiol.

Les spectres d'émission et d'excitation de la fluorescence montrent la présence dans l'incubation microsomale de souris, de ces deux métabolites, déjà identifiés chez le rat (Fig. IV.4a et b). Ces spectres de luminescence à 77°K permettent d'attribuer au métabolite formé en présence des microsomes de souris et élué au même temps que le 10,11,12,13-tétrol, la même structure que celui-ci. Toutefois, la vitesse de formation de ce métabolite chez la souris est très faible.

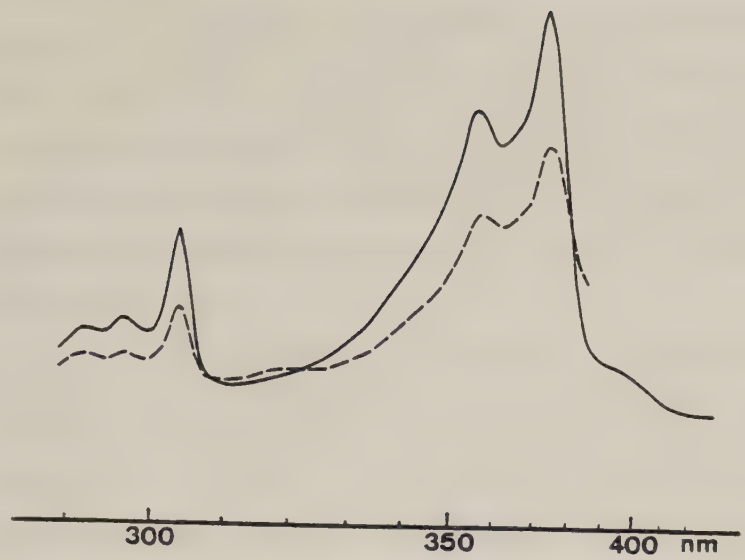


FIG. IV-4a. — Spectres d'excitation du 10,11,12,13-tetrol. Microsomes de rat (——) et de souris (----).

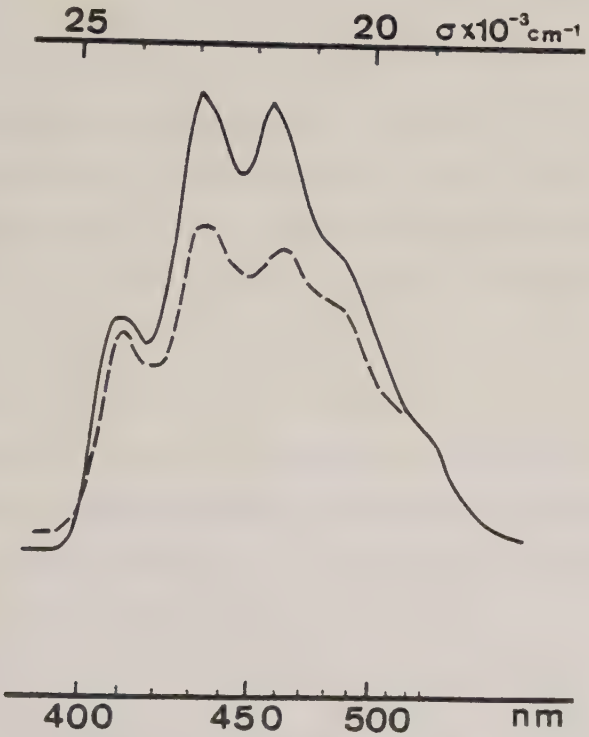


FIG. IV-4b. — Spectres de fluorescence (77°K, éthanol absolu) du 10,11,12,13-tetrol. Microsomes de rat (——) et de souris (----).

Par contre, le rendement quantitatif du 2-hydroxy-12,13-dihydrodiol subit une augmentation relativement importante en présence des microsomes hépatiques de souris. L'activité enzymatique des microsomes de souris semble donc plus orientée vers l'hydroxylation au niveau du carbone 2, tandis que le système microsomal de rat catalyse avec une très grande efficacité la formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol. La vitesse de formation du 3,4-dihydrodiol-12,13-

dihydrodiol (3,4,12,13-tétrol), semble être indépendante du système microsomal utilisé.

L'examen des diagrammes de la Fig. IV.3 révèle l'existence d'autres métabolites formés en très faibles quantités. Parmi ceux-ci, certains ne se forment qu'en présence de microsomes hépatiques de souris. C'est le cas notamment des deux pics qui migrent respectivement avant le 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol et avant le 3,4,12,13-tétrol. En revanche, le métabolite dont le temps de rétention correspond approximativement à 20 minutes, n'est produit qu'avec le système enzymatique de rat.

Chez le rat, le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol constitue le principal métabolite devant lequel tous les autres produits formés peuvent être négligés quantitativement. Un dosage approximatif ne lui attribue cependant qu'une quantité située aux alentours de 9 µg. Autrement dit, la plus grande partie de la métabolisation globale du 12,13-dihydrodiol (72,5 µg sur 80 µg) n'est pas due à la conversion de celui-ci en produits éluables en HPLC.

Comme ce fut le cas pour le métabolisme du 3,4-dihydrodiol, nous sommes donc amenés à admettre qu'une importante proportion du 12,13-dihydrodiol est transformée en composés autres que ceux élués en HPLC. Le fait même que le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol soit absent chez la souris permet d'affirmer que l'ensemble des métabolites illustrés sur le chromatogramme discontinu (souris) de la Fig. IV.3 est négligeable devant celui formé en présence des microsomes hépatiques de rats. Il n'en demeure pas moins établi, comme nous l'avons signalé plus haut, que le 12,13-dihydrodiol est globalement plus métabolisé avec le système microsomal de la souris qu'avec celui du rat. Ces résultats confirment l'existence, au sein des microsomes, de deux types de réactions enzymatiques. Le premier est celui qui conduit à la formation de tous les métabolites observés et serait plus efficace chez le rat que chez la souris. En revanche, l'autre voie, qui transforme une grande proportion du dihydrodiol en produits non éluables en HPLC, serait plus importante chez la souris que chez le rat. Ces composés non éluables en HPLC seraient vraisemblablement insolubles dans le volume injecté à l'entrée de la colonne chromatographique (0,7 ml méthanol, 0,15 ml H_2O). En effet, nous avons constaté que dans le fond du ballon où l'ensemble des métabolites extraits à l'acétate d'éthyle ont été concentrés, subsiste un résidu qui ne se dissout que dans le chloroforme ou l'acétate d'éthyle. Les spectres d'absorption dans le visible des deux résidus résultant de chacune des incubations, après dissolution dans le chloroforme, ne présentent aucune structure vibrationnelle. A partir des densités optiques, et en prenant des coefficients d'extinction analogues à ceux du 12,13-dihydrodiol, nous avons constaté que le résidu provenant de l'incubation microsomale de souris et celui provenant de l'incubation microsomale de rat, représentent respectivement 23 et 15 µg. Il s'agit donc d'une fraction relativement

importante du dihydrodiol de départ qui a été transformée en ces composés. Ils représentent le produit principal de la métabolisation globale du 12,13-dihydrodiol.

C'est sans doute, la raison pour laquelle la quantité totale du 12,13-dihydrodiol transformée par les microsomes de souris est plus importante que celle métabolisée par le système enzymatique de rat, alors que les deux profils d'élution des métabolites observés en HPLC, laissaient penser le contraire.

La structure de ces produits insolubles n'a pas été élucidée. Toutefois, l'absence de bandes fines dans leurs spectres d'absorption laisse supposer qu'il s'agit probablement de structures quinoniques. On peut penser à une oxydation analogue à celle qui transforme le 3,4-dihydrodiol en 3,4-diphénol. Dans ce cas, le 12,13-diphénol serait très instable et les produits qui en dérivent seraient insolubles dans le méthanol.

III - CONCLUSION

D'abord, nous constatons que le métabolisme primaire du DBF, selon que nous utilisons un système enzymatique ou l'autre, n'est que très peu perturbé. Le 3-méthylcholanthrène induit donc, chez la souris comme chez le rat, des activités enzymatiques analogues responsables de la métabolisation de structures aromatiques très hydrophobes.

Cette similitude métabolique est prévisible puisque nous savons que le 3-méthylcholanthrène induit chez la souris et chez le rat la synthèse d'enzymes impliquées dans le métabolisme de substrats très hydrophobes, qui sont constitués principalement par la forme P_1-450 (microsomes hépatiques de souris) et la forme $P\text{-}450_c$ (microsomes hépatiques de rat). En effet, nous avons vu que ces deux enzymes avaient une très grande affinité pour le benzo(a)pyrène bien qu'elles ne soient pas vraisemblablement tout à fait identiques.

Par contre, c'est au niveau du métabolisme secondaire que nous avons observé des différences très caractéristiques entre les deux systèmes microsomaux étudiés.

Quand le 3,4-dihydrodiol et le 12,13-dihydrodiol sont incubés, ils se métabolisent avec un grand rendement aussi bien en présence des microsomes de rat qu'en présence de ceux de souris. Les souris disposent cependant d'une activité enzymatique globale nettement plus importante que celle des rats. Contrastant avec celle-ci, la métabolisation apparente des deux dihydrodiols (formation des métabolites élués en HPLC), est plus efficace chez le rat que la souris.

L'étude comparative du métabolisme du 12,13-dihydrodiol offre un grand intérêt. Elle montre en effet, l'existence exclusive chez le rat, d'une activité enzymatique conduisant spécifiquement à l'hydroxylation des carbones 3 du 12,13-dihydrodiol et du 10,11,12,13-tétrol. Comme les deux espèces animales sont

capables de produire métaboliquement avec des rendements analogues, le 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol, il devient difficile d'imaginer un processus enzymatique unique conduisant à la fois au 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol et au 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol. En d'autres termes, ces deux composés ne peuvent être issus d'un même intermédiaire métabolique, le 3,4-époxy-12,13-dihydrodiol. Il s'agit donc de deux activités enzymatiques distinctes qui, compte tenu des résultats qui seront présentés dans le chapitre suivant, feraient intervenir deux enzymes différentes ; l'une d'elles, responsable de l'hydroxylation du carbone 3, serait donc déficiente chez la souris.

Selon cette interprétation, nous sommes conduits à admettre que l'hydroxylation du 12,13-dihydrodiol et du 10,11,12,13-tétrol, portant sur le carbone 2 doit être induite par une enzyme différente de celle catalysant l'hydroxylation en position 3. Cette activité enzymatique est en effet présente chez les deux espèces étudiées. Nous pouvons apporter deux arguments expérimentaux étayant cette dernière hypothèse. Tout d'abord, le fait que l'hydroxylation en 3 s'effectue préférentiellement à partir du 12,13-dihydrodiol alors que l'hydroxylation en 2 est plus efficace avec le 10,11,12,13-tétrol, permet de supposer l'existence de deux enzymes distinctes ayant une spécificité différente vis-à-vis des deux substrats. D'autre part, nous avons mentionné au cours du Chapitre III que les hydroxylations du 10,11,12,13-tétrol portant sur les sommets 2 et 3 sont fortement influencées quantitativement par la concentration en substrat utilisée. Un tel comportement est très compatible avec l'hypothèse de deux enzymes ayant des constantes d'affinité différentes pour un même substrat. Il en résulte que l'ensemble des voies métaboliques empruntées par le DBF et ses dérivés, ne peut être associé à l'activité d'une seule forme enzymatique. S'il est bien admis, que le 3-méthylcholanthrène induit une forme prédominante (P-450$_c$ ou P$_1$-450 selon l'espèce) responsable du métabolisme des substances hydrophobes (le DBF par exemple), d'autres formes enzymatiques doivent être présentes dans les membranes microsomales et seraient surtout spécialisées dans la métabolisation des composés relativement plus polaires. Nous donnerons dans le chapitre suivant d'autres arguments expérimentaux plaidant en faveur de cette hypothèse multienzymatique et nous présenterons un modèle de l'interaction enzyme-substrat.

Deux autres caractéristiques issues des études métaboliques présentées dans ce Chapitre méritent d'être mentionnées :

- d'abord, dans la mesure où il existe une corrélation entre dose et effets biologiques, il est important de noter que le système microsomal de la souris, comparé à celui des rats, ne produit qu'une très faible quantité de 10,11,12,13-tétrol. Il est donc possible, en prenant en considération la théorie de la région baie, que les effets biologiques du 12,13-dihydrodiol sur le rat et sur la souris ne soient pas les mêmes.

- les différences quantitatives observées entre les deux espèces, sont comparables pour les métabolites correspondant aux sites 12-13 et 6-7 (métabolisme du DBF et du 3,4-dihydrodiol). Il apparaît donc que tout facteur limitant la vitesse de formation d'un métabolite associé à l'un de ces sites affecte également celle des métabolites associés à l'autre site. Les deux liaisons 6-7 et 12-13 paraissent donc, métaboliquement, très dépendante.

CHAPITRE V

Action du norharman sur le métabolisme du dibenzo(a,e)fluoranthène

I - INHIBITEURS ET ACTIVATEURS DES CYTOCHROMES P-450

Il existe un très grand nombre de substances chimiques pouvant intervenir sur les réactions enzymatiques catalysées par les cytochromes P-450, pour les inhiber ou au contraire les "activer.

L'inhibition peut être irréversible et elle aboutit alors le plus souvent à la dénaturation et à la destruction de l'enzyme. Il s'agit, généralement, de processus faisant intervenir des interactions covalentes entre l'inhibiteur et le site actif des monooxygénases. Une activation métabolique préalable, transformant l'inhibiteur en un intermédiaire réactif (époxydes, radicaux libres, ions carboniums ...) est souvent requise pour ce genre d'inhibition. Parmi les composés susceptibles d'aboutir à la destruction des c tochromes P-450 (après activation enzymatique) se trouvent des substances contenant une double ou une triple liaison (éthylène, acéthylène) (147,148), le parathion (150) ainsi que certains médicaments carcinostatiques tels que le cyclophosphamide (149).

Quant aux inhibiteurs des monoxygénases, agissant tels quels, sans être métabolisés, ils font généralement intervenir des phénomènes réversibles pouvant être caractérisés par des études cinétiques classiques. Il s'agit de composés qui agissent principalement au niveau des sites 1,3,4,8 ou 9 de la Fig. V.1. C'est-à-dire

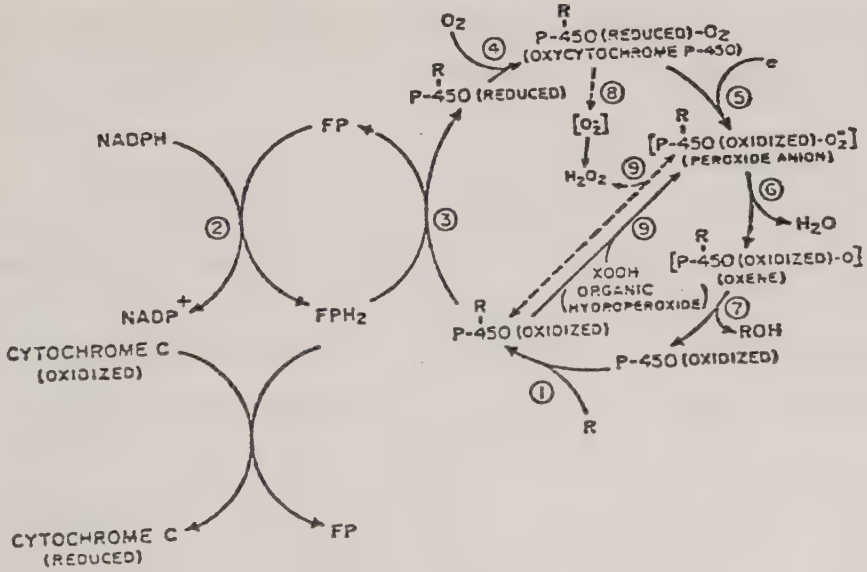


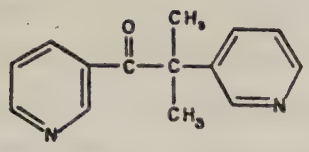
FIG. V-1. — Chaîne microsomale de transport d'électrons.

qu'ils sont susceptibles de modifier l'interaction du cytochrome P-450 avec son substrat, l'interaction cytochrome P-450-NADPH-cytochrome P-450-réductase, l'oxygénation du site actif du cytochrome P-450 et la formation de peroxydes impliqués dans certaines activités hydroxylantes des monooxygénases.

Ces inhibiteurs appartiennent à une classe de composés très variée parmi lesquels se trouvent le 2-diéthylaminoéthyl-2,2-diphénylvalérate (SKF-525A), la métyrapone, l' -naphtoflavone, le dichlorophénylphénoxyéthylamine (DPEA), l'imidazole, le monooxyde de carbone, le DDT, la pyridine, la n-octylamine et la 7,8-benzoflavone. Par contre, certaines substances chimiques semblent agir sur les monooxygénases hémoprotéiques, en activant les réactions enzymatiques. Ainsi, l'acétone et les sels des acides cyanhydrique et isocyanique sont capables d'activer l'hydroxylation de l'aniline (153,154). Il semble, en fait, que l'acétone intervient en stimulant la fonction peroxydative du cytochrome P-450, c'est-à-dire les voies 8 et 9 de la Fig. V.1 (153). Certains détergents se sont révélés capables d'activer le métabolisme du benzène en présence de microsomes hépatiques (155). Au cours de la reconstitution in vitro du système enzymatique microsomal, ces détergents peuvent se substituer à la fraction lipidique sans modifier la N-déméthylation de la benzphétamine (156). Cela laisse supposer que ces détergents pourraient agir en favorisant certaines interactions entre le cytochrome P-450 et la NADPH-cytochrome P-450-réductase. Notons aussi que plusieurs cancérogènes, ainsi que certains stéroïdes pourraient induire l'activation de la 2-hydroxylation du biphényle (157).

Il est important de signaler que la métyrapone, considérée comme un inhibiteur des monooxygénases dans la mesure où elle inhibe in vitro le métabolisme hépatique du dapsone, du fluoroxène, de l'halothane, de l'hexobarbitone, de la morphine, du trichloroéthylène, et du trichlorofluorométhane (159,160), se comporte comme un activateur de l'hydroxylation de l'acétanilide (158).

Il faut mentionner aussi que la 7,8-benzoflavone stimule l'hydroxylation du benzo(a)pyrène en présence de microsomes hépatiques de lapin, de hamster ou d'humains (182). On sait actuellement que cela est dû, d'une part, à la multiplicité enzymatique chez une espèce animale donnée, et d'autre part, à la spécificité manifestée par ces inhibiteurs (ou activateurs) vis-à-vis des formes différentes de l'enzyme. Ainsi, il est bien établi que la métyrapone (Fig. V.2a), en présence d'un



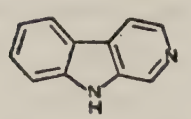


FIG. V-2a. — Structure de la metyrapone.

FIG. V-2b. — Structure du norharman.

système microsomal de foie de rat, inhibe spécifiquement la forme inductible par le phénobarbital ($P\text{-}450_b$) (162). L'inhibition, dans ce cas, résulte de la formation d'un complexe sur le fer du site actif, auquel la métyrapone se lie en donnant le doublet électronique associé à l'azote pyridinique.

Il en va de même pour la 7,8-benzoflavone qui peut agir comme un inhibiteur ou comme un activateur des monooxygénases selon la nature du substrat et l'espèce animale.

Des études récentes ont montré qu'en présence de microsomes hépatiques de lapin, la 7,8-benzoflavone stimule l'activité de l'une des deux formes enzymatiques présentes ($P\text{-}450_I$) et qu'en même temps elle inhibe celle de l'autre ($P\text{-}450_{II}$) (161). Toujours selon ces études, l'action de cet effecteur enzymatique se situe au niveau de la NADPH-cytochrome P-450 réductase avec laquelle il formerait un complexe ne pouvant interagir qu'avec $P\text{-}450_I$ (161).

Ainsi, il apparait, à partir des deux exemples précédents (la métyrapone et la 7,8-benzoflavone) que l'activation et l'inhibition des monooxygénases est une notion très relative régit par la spécificité de l'effecteur vis-à-vis de ces monooxygénases.

Le norharman (NH) (9H-pyrido(3,4-b)indole) (Fig. V.2b) est une β-carboline qu'on rencontre principalement dans les goudrons de tabac et dans les produits issus de la pyrrolyse des protéines alimentaires (24,25). C'est un composé chimique qui, sur le plan biologique, revêt une importance particulière dans la mesure où il s'est avéré posséder un pouvoir "comutagène". En effet, non seulement

le norharman est capable de stimuler la mutagénicité de certains cancérogènes chimiques tels que le benzo(a)pyrène et le 2-acétylaminofluorène (26,27), mais il est également susceptible de rendre mutagènes des substances initialement inactives (28). Le mécanisme selon lequel le norharman induit ces effets biologiques reste cependant obscur. Une des hypothèses proposé fait intervenir l'action de ce produit au niveau des monooxygénases microsomales impliquées dans l'activation et la détoxification des substances mutagènes et cancérogènes.

En effet, le norharman s'est révélé être un effecteur du métabolisme du DBF (31) et du benzo(a)pyrène. Des études effectuées par Fujino et al. (29,30) montrent qu'en présence de microsomes hépatiques de rat, le norharman agit en inhibant le métabolisme global du benzo(a)pyrène. Toutefois, c'est la formation des métabolites les plus polaires (les métabolites hydrosolubles et les métabolites secondaires) qui est la plus efficacement inhibée (30), faisant ainsi apparaître une activation apparente au niveau des métabolites primaires du benzo(a)pyrène (29). Une telle activation a été aussi observée au cours de la métabolisation du DBF (31).

Le mécanisme de cette inhibition n'est pas tout à fait élucidé. Les études spectroscopiques semblent cependant montrer que l'addition du norharman aux microsomes fait apparaitre des caractéristiques spectrales de type II (30). Ainsi, l'inhibiteur agirait vraisemblablement d'une façon analogue à celle de la métyrapone en contractant une liaison de coordinance avec le fer du cytochrome P-450, ce qui bloque le site oxygénant de l'enzyme (site 4 de la Fig. V.1).

Dans ce chapitre, nous décrivons les effets du norharman sur l'ensemble des voies métaboliques du dibenzo(a,e)fluoranthène. Ces études ont été effectuées en présence de microsomes hépatiques de rats préalablement traités au 3-méthylcholanthrène.

II - EFFETS DU NORHARMAN SUR LES VOIES METABOLIQUES DU DBF

A) Métabolisme du DBF

L'effet du norharman sur la production des métabolites du DBF extractibles à l'acétate d'éthyle est illustré sur la Fig. V.3. Le chromatogramme en trait continu représente le profil d'élution de l'ensemble de ces métabolites produits par une incubation microsomale du DBF effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre II. Le chromatogramme en trait discontinu résulte d'une incubation identique dans laquelle nous avons ajouté du norharman à une concentration de 0,9 mM.

Nous constatons une activation métabolique apparente associée à la présence de l'effecteur dans l'incubation microsomale. La formation du 3,4-dihydrodiol (pic 6), du 12,13-dihydrodiol (pic 7) et du 7-hydroxy-DBF (pic 8) est fortement stimulée ; l'intensité de production du 3,4-dihydrodiol est multipliée par

un facteur 12 environ tandis que celle des deux autres métabolites est quadruplée.

En revanche, les deux phénols portés par la liaison 3-4, le 3-hydroxy-DBF (pic 9) et le 4-hydroxy-DBF (pic 10), apparaissent comme des métabolites mineurs sur le chromatogramme discontinu. Le norharman semble donc empêcher la formation de ces deux métabolites.

Comme l'indique la Fig. V.3, 0,9 mM de norharman inhibe également

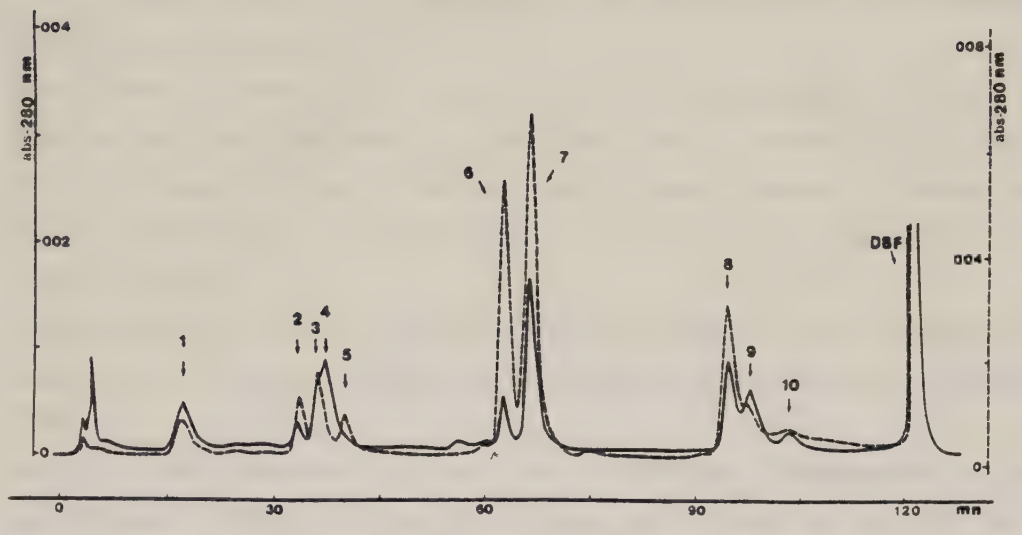


FIG. V-3. — Séparations en HPLC des métabolites du DBF obtenus en absence (——) et en présence (----) de 0,9 mM de norharman.

fortement la formation du métabolite 4 dont la structure n'a pas été identifiée (voir Chapitre II). La présence de la -carboline stimule la formation des deux dihydrodiols diaxiaux, le 10,11-dihydrodiol (pic 2) et le 1,2-dihydrodiol (pic 3) qui sont approximativement 4 fois plus abondants. Les deux pics 1 et 5 correspondent à des métabolites secondaires dont les structures respectives sont le 12,13-dihydrodiol-3,4-dihydrodiol et le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol. Si le norharman ne semble pas modifier la formation du premier métabolite, il stimule par contre la production du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol qui est quasiment indétectable sur le chromatogramme continu.

Cette étude métabolique montre que l'action du norharman sur le métabolisme du DBF par les microsomes hépatiques de rats induits au 3-méthylcholanthrène est semblable à celle observée pour le benzo(a)pyrène. Dans les deux cas, on obtient une activation apparente du métabolisme primaire. Il est cependant important de mentionner deux caractères particuliers de cette étude métabolique :

- le premier est que cette activation apparente ne touche ni le 3-hydroxy-DBF ni le 4-hydroxy-DBF (pics 9 et 10) et que la formation de certains métabolites

primaires peut donc être inhibée par le norharman.

- la deuxième caractéristique résulte de l'aspect quantitatif de l'activation des différents métabolites. Nous constatons, en effet, que la formation du 3,4-dihydrodiol est nettement plus stimulée que celles du 12,13-dihydrodiol et du 7-hydroxy-DBF.

Les avantages de l'incubation microsomale du DBF en présence de norharman sont nombreux :

- tout d'abord, l'identification des structures des métabolites 2,3 et 5 n'a été possible que grâce à l'utilisation du norharman dans la mesure où les quantités de produits nécessaires pour la RMN ont pu être ainsi obtenues et l'inhibition quasi totale du métabolite 4 a facilité l'étude de la structure du métabolite 3 obtenu ainsi à l'état pur.
- d'autre part, c'est grâce à cette activation que nous avons pu mener les études métaboliques décrites au Chapitre III (métabolisme secondaire et tertiaire du DBF).
- enfin, il faut signaler que les tests biologiques (mutagénèse et pouvoir cancérogène) réalisés avec les trois principaux métabolites (pics 6, 7 et 8) ont été considérablement facilités par l'emploi du norharman dans l'incubation du DBF.

B) Métabolisme du 7-hydroxy-DBF

La Fig. V.4 illustre les profils d'élution des métabolites formés en

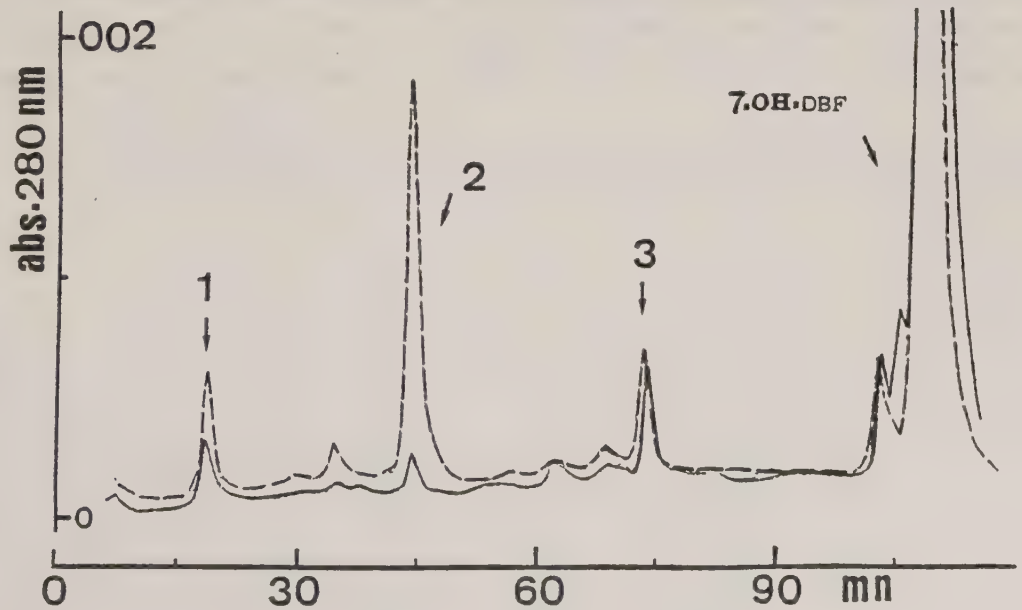


FIG. V-4. – Séparations en HPLC des métabolites du 7-hydroxy-DBF obtenus en absence (———) et en présence de 0,9 mM de norharman.

incubant le 7-hydroxy-DBF avec ou sans norharman. L'incubation microsomale effectuée en présence de 0,9 mM de β -carboline (chromatogramme discontinu) montre que la production du 7-hydroxy-10,11-dihydrodiol (pic 1) est triplée tandis que celle du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol (pic 2) est multipliée par 12. Les deux incubations dont sont issues les deux profils d'élution de la Fig. V.4 ont été effectuées dans les conditions opératoires décrites dans le Chapitre II, c'est-à-dire en utilisant 50 ug de 7-hydroxy-DBF pour 30 mg de protéines microsomales. La durée de l'incubation est de 35 minutes. Le dosage de la fraction non métabolisée du 7-hydroxy-DBF correspond à 30 µg à partir de l'incubation effectuée sans norharman et 20 µg à partir de la deuxième. C'est un fait très important dans la mesure où il montre que l'activation métabolique observée n'est pas apparente mais réelle.

Ces résultats semblent s'opposer à ceux de Fujino (7) pour deux raisons. La première est que le métabolisme global du 7-hydroxy-DBF est activé par le norharman. La deuxième est que la conversion d'un métabolite relativement polaire (le 7-hydroxy-DBF) en d'autres formes plus polaires (pics 1 et 2) n'est pas métaboliquement inhibée par la β-carboline.

C) Métabolisme du 12,13-dihydrodiol

L'analyse en HPLC des métabolites formés par incubation microsomale du 12,13-dihydrodiol, sans et avec norharman (0,9 mM) est représentée sur la Fig. V.5. Les deux incubations ont été effectuées en présence de 30 mg de protéines microsomales et de 100 µg de substrat (l'incubation du 12,13-dihydrodiol présentée dans le Chapitre III n'utilisait que 80 µg de substrat). Nous avons constaté, en effet, qu'un excès d'hydrocarbure se traduit par l'inhibition de la formation du 10,11,12,13-tétrol (pic 5).

La Fig. V.5 montre que le norharman (chromatogramme en trait discontinu)

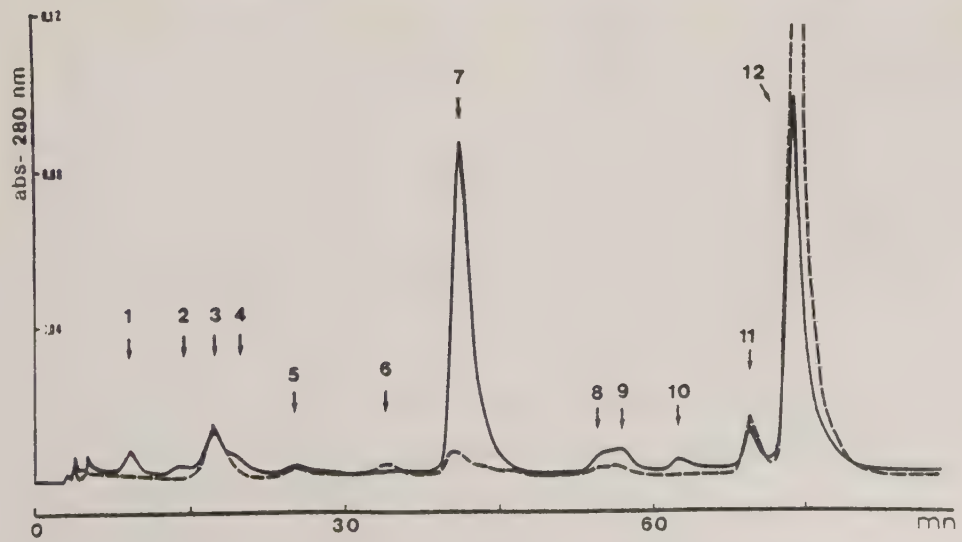


FIG. V-5. — Séparations en HPLC des métabolites du 12,13-dihydrodiol obtenus en absence (——) et en présence de 0,9 mM de norharman.

inhibe le métabolisme total du 12,13-dihydrodiol dont la fraction non métabolisée (pic 12) en présence de la β-carboline est plus que doublée. Nous constatons en effet sur le chromatogramme discontinu de la Fig. V.5, la disparition quasi totale du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (pic 7), c'est-à-dire du principal métabolite formé en absence de l'inhibiteur. D'autres métabolites sont aussi inhibés, parmi lesquels figurent le 3-hydroxy-10,11,12,13-tétrol (pic 1) ainsi que les métabolites correspondant aux pics 2, 4, 8, 9 et 10.

Nous pouvons cependant constater qu'il existe des métabolites dont la formation n'est pas inhibée par le norharman. C'est le cas notamment du 10,11,12,13-tétrol (pic 5) et celui du 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol (pic 3) dont la production est même légèrement stimulée par la présence de l'effecteur. Cette sélectivité de l'inhibition par le norharman de la formation des métabolites du 12,13-dihydrodiol montre que le norharman n'agit pas en inhibant systématiquement la formation de métabolites polaires.

Enfin, il est bien clair d'après ces résultats que le 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol (pic 3) est le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (pic 7) ne peuvent être issus d'un même précurseur métabolique (l'époxyde au niveau de la liaison 3-4). Ces deux métabolites résultent donc de deux activités enzymatiques distinctes, dont une seul est sensible à l'action du norharman. On confirme ainsi une conclusion du Chapitre précédent.

D - Métabolisme du 3,4-dihydrodiol

L'incubation de 100 µg de 3,4-dihydrodiol en présence de 30 mg de protéines microsomales et de 0,9 mM de norharman, aboutit à l'inhibition quasi totale de tous les dérivés métaboliques (Fig. V.6). Le pic correspondant à la fraction non métabolisée (pic 6) devient donc plus intense.

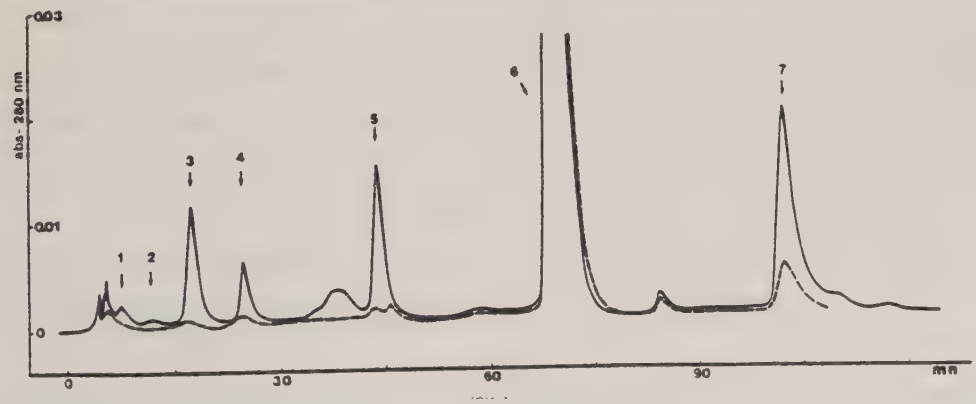


FIG. V-6. - Séparations en HPLC des métabolites du 3,4-dihydrodiol obtenus en absence (——) et en présence de 0,9 mM de norharman.

Contrairement à ce qui a été observé avec le 12,13-dihydrodiol, l'inhibition des métabolites du 3,4-dihydrodiol n'est pas sélective.

Pour convertir le DBF en 12,13-dihydrodiol-3,4-dihydrodiol (pic 3 de la Fig. V.6 et pic 3 de la Fig. V.5), les enzymes microsomales de rats disposent de deux voies distinctes en passant respectivement par le 12,13-dihydrodiol et le 3,4-dihydrodiol. Il est important de constater que le norharman inhibe sélectivement la seconde voie. Il en va de même pour la formation métabolique du 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol (dérivé commun aux métabolismes du 7-hydroxy-DBF et du 3,4-dihydrodiol) ; la formation de ce métabolite n'est inhibée par le norharman que si elle résulte du 3,4-dihydrodiol.

Il apparaît donc clairement que le 12,13-dihydrodiol-3,4-dihydrodiol et le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol produits par le métabolisme du DBF en présence de norharman (Fig. V.3 : chromatogramme discontinu) ne peuvent résulter que de la remétabolisation simultanée du 12,13-dihydrodiol ou du 7-hydroxy-DBF.

E - Métabolisme du 1,2,3,4-tétrol et du 10,11,12,13-tétrol

Dans les deux cas, aucun métabolite détectable en HPLC n'a été obtenu quand l'incubation du tétrol s'effectuait en présence de 0,9 mM de norharman. Celui-ci inhibe donc toutes les voies métaboliques étudiées au Chapitre III qui aboutissent essentiellement à l'hydroxylation du 10,11,12,13-tétrol en position 2 et 3 et à celle du 1,2,3,4-tétrol en position 7.

F - Cinétique de l'inhibition de la formation enzymatique du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol

Nous avons vu qu'en présence de 12,13-dihydrodiol, les microsomes hépatiques de rats manifestait une forte activité enzymatique aboutissant au 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol. Celui-ci constitue, de loin, le principal métabolite formé. Même en réduisant la durée de l'incubation microsomale, il est donc possible d'obtenir suffisamment de ce produit pour qu'il puisse être facilement détectable. Toutes les incubations qui seront mentionnées dans ce sous-paragraphe ont duré 10 mn. Cette durée est suffisamment courte pour que la réaction soit assimilée à une réaction d'ordre zéro. Dans ces conditions, la quantité de produit apparue est proportionnelle à la vitesse initiale de la réaction enzymatique.

a) Effet du norharman sur la vitesse de formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol

L'influence du norharman sur cette vitesse a été étudiée en incubant le 12,13-dihydrodiol en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur. La quantité du produit formé (donc la vitesse de la réaction) ainsi que la quantité du substrat non métabolisé, sont déterminées par l'intensité de la fluorescence émise

par chacun des deux composés.

La concentration initiale en substrat dans chacune des incubations est de 6,5 uM. La quantité de 12,13-dihydrodiol métabolisé est déterminée par comparaison à la fraction récupéré au cours d'une incubation témoin sans NADPH. La Fig. V.7 illustre l'effet du norharman (de 0 à 7.10^{-4} M) d'une part sur la vitesse de formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (courbe continue) et d'autre part, sur le pourcentage du substrat métabolisé (courbe discontinue). Nous constatons que ces deux courbes ont des évolutions opposées pour des concentrations de norharman variant de 0 à 2×10^{-4} M ; tout en inhibant le métabolisme total du 12,13-dihydrodiol, ces faibles concentrations activent légèrement la formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol puis l'inhibe à partir de 2×10^{-4} M en norharman.

b) Nature de l'inhibition de la formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol

La représentation de Baxter de la courbe continue de la Fig. V.7 est présentée sur la Fig. V.8 pour trois concentrations initiales différentes de substrat. Il est important de constater qu'au-delà de 2×10^{-4} M en norharman, les vitesses de formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol évoluent de façon michaelienne. Selon ces cinétiques, l'inhibition est non compétitive ; le norharman ne modifie pas l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat, le 12,13-dihydrodiol. La Fig. V.9 montre une représentation de Lineweaver et Burk de la relation de Michaelis ; l'inverse de la vitesse de formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol est représentée en fonction de l'inverse de la concentration du substrat pour deux concentrations différentes de norharman (2.10^{-4} M et $4,6.10^{-4}$ M). Les deux droites correspondantes confirment le caractère non compétitif de l'inhibition.

Toutefois, nous devons souligner que les cinétiques d'inhibition aboutissant à ce résultat font intervenir des concentrations de norharman supérieures à 2.10^{-4} M. A plus faibles concentrations, la -carboline agit en stimulant légèrement la formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol (Fig. V.7). Il est important également de noter que cette activation n'apparait que pour les concentrations de substrat relati ement faibles (Fig. V.8). Ainsi, l'effet activateur du norharman sur la formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol tend à disparaître avec l'élévation de la concentration initiale du substrat. Il est possible que cette activation initiale ne soit qu'un phénomène apparent dû vraisemblablement, à des mesures erronées de la vitesse de formation du métabolite en présence de faibles concentrations de norharman.

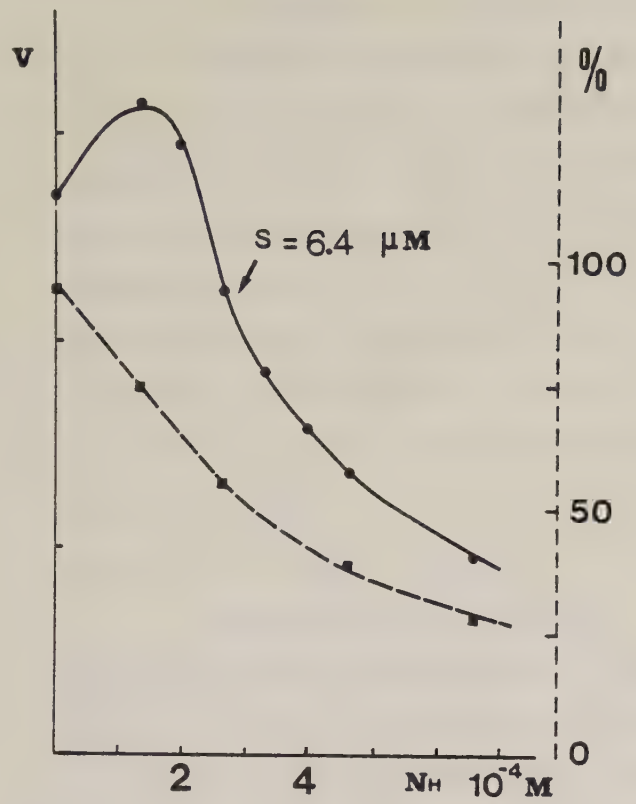


FIG. V-7

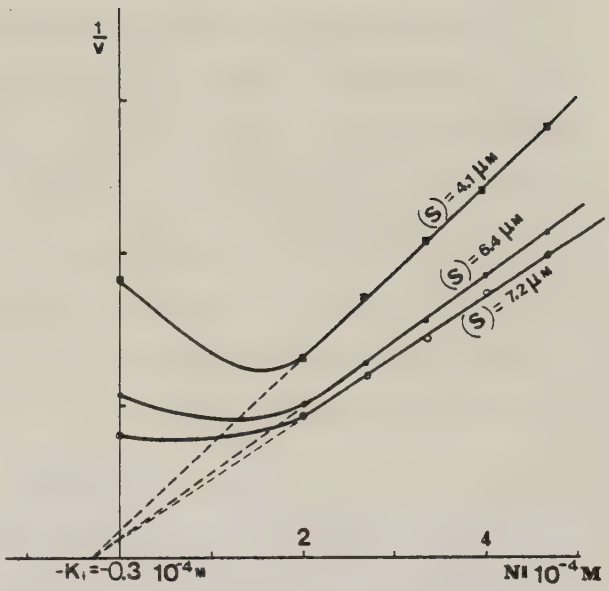


FIG. V-8

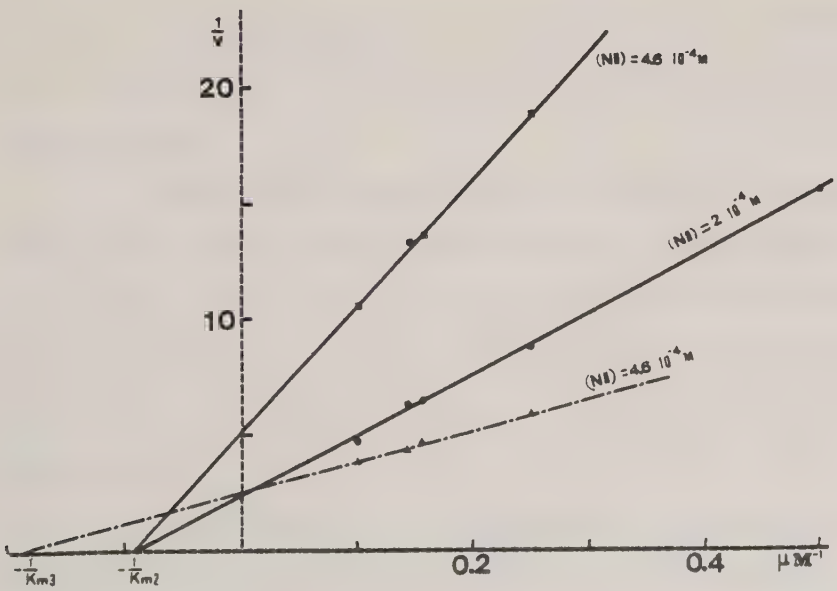


FIG. V-9

Discussion

L'inhibition de la métabolisation des dihydrodiols et des tétrols est nécessairement due à l'inactivation des monooxygénases. Les études cinétiques des effets du norharman sur le métabolisme du 12,13-dihydrodiol permettent de préciser le mécanisme d'action. Elles suggèrent que l'inhibition de la formation d'un métabolite donné, le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol, est non compétitive ; le norharman ne modifie pas l'affinité apparente de l'enzyme pour le 12,13-dihydrodiol et n'agit donc pas au niveau du site 1 de la Fig. V.1. Ce résultat corrobore celui de Fujino selon lequel l'inhibition du métabolisme total du benzo(a)pyrène par le norharman est également non compétitive ; les résultats spectroscopiques de cet auteur suggèrent que cette inhibition est liée au blocage du site oxygénant de l'hème de l'enzyme (site 4 de la Fig. V.1) par le doublet électronique de l'azote pyridinique du norharman. Celui-ci agirait ainsi d'une façon analogue à celle de la pyridine et de la métyrapone (33,34).

Les mêmes études cinétiques montrent que le norharman n'a aucune action sur la vitesse de formation du 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol ; toutes les droites issues de la représentation de Lineweaver et Burk de la relation de Michaelis associée à ce métabolite sont superposables quelque soit la concentration de l'effecteur enzymatique. Sur la Fig. V.9, nous avons représenté l'une d'elles pour une concentration de norharman égale à $4{,}6.10^{-4}$ M.

Dès lors, il apparaît clairement que le 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol et le 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol ne résultent pas d'une seule activité enzymatique, c'est-à-dire d'un précurseur métabolique commun ; il est possible qu'une enzyme unique peut catalyser deux réactions distinctes à partir d'un même substrat et aboutir àla formation de ces deux métabolites. Toutefois, l'inhibition non compétitive (vraisemblablement au niveau du site actif) et sélective du norharman ainsi que les études comparatives du chapitre précédent, vont à l'encontre d'une telle hypothèse.

Nous sommes ainsi amenés à admettre l'existence de deux formes enzymatiques distinctes dont chacune est impliquée dans la formation d'un des deux métabolites. L'une d'elles (ou son homologue) serait déficiente chez la souris. Le norharman doit agir en inhibant sélectivement une des deux formes enzymatiques ; l'activité de l'enzyme catalysant la conversion du 12,13-dihydrodiol en 3,4-dihydrodiol-12,13-dihydrodiol n'est pas altérée par l'effecteur (ou du moins faiblement).

Nos résultats font ainsi apparaître que plusieurs formes enzymatiques présentes chez le rat (au moins deux) sont impliquées dans le métabolisme du DBF et de ces dérivés. La ou (les) isoenzyme(s) plus spécifique(s) des substrats relativement polaires (dihydrodiols) est (ou sont) sensible(s) à l'action du norharman.

Par contre, la (ou les) forme(s) enzymatique(s) impliquée(s) dans le métabolisme de composés plus ou moins hydrophobes (DBF, 7-hydroxy-DBF) mais aussi dans certaines voies métaboliques du 12,13-dihydrodiol est (ou sont) insensible(s) à l'inhibiteur. Compte tenu de la constitution en cytochromes P-450 des microsomes hépatiques de rats induits au 3-méthylcholanthrène et de leurs propriétés catalytiques (voir chapitre précédent), la forme non inhibée serait essentiellement celle inductible au 3-méthylcholanthrène, c'est-à-dire P-450$_c$.

L'activation de la production des métabolites du DBF et du 7-hydroxy-DBF n'est pas donc forcément due à une stimulation par le norharman, de l'activité des monooxygénases, c'est-à-dire à une augmentation de la vitesse de la réaction enzymatique. Nous pensons que trois facteurs, au moins, peuvent concourir à cet effet "activateur" du norharman, sur la production de ces métabolites :

- Nous avons vu que le norharman inhibe la métabolisation globale des métabolites polaires tels que les dihydrodiols. Il inhibe également la fixation covalente d'espèces métaboliques réactives (époxydes, radicaux libres ...) sur les macromoléculaires cellulaires (31,164). Dans les deux cas, cela conduit à une accumulation des métabolites extractibles.

- Les études effectuées par Vaz et coll. (32) ont montré que le norharman agit en stimulant l'activité de l'époxyde hydrolase (enzyme microsomale impliquée dans l'hydrolyse des époxydes en dihydrodiols). Cela pourrait expliquer, au moins partiellement, la forte production du 3,4-dihydrodiol (comparativement à celle du 12,13-dihydrodiol) obtenue en présence du norharman. Celle-ci est, en effet, associée à une diminution relative de la formation des deux phénols, le 3- et le 4-hydroxy-DBF (Fig. V.3) ; ces deux métabolites doivent résulter d'un réarrangement interne non enzymatique du 3,4-époxy-DBF, entrant en compétition avec l'hydrolyse de l'époxyde en dihydrodiol ; l'activation de cette deuxième réaction aboutit donc à la diminution de la production des phénols.

Selon l'hypothèse où le norharman stimule l'activité de l'époxyde hydrolase, la formation des dihydrodiols serait aussi favorisée aux dépens de celle des produits d'addition (en augmentant la vitesse de l'hydrolyse des époxydes, on diminue leur probabilité d'agir sur les macromolécules cellulaires).

- L'"activation" de la production des métabolites du DBF et du 7-hydroxy-DBF, peut aussi résulter d'une augmentation de la quantité de substrat métabolisée en 35 minutes (comme on l'a observé pour le 7-hydroxy-DBF). Une telle activation pourrait résulter uniquement d'apport supplémentaire de NADPH à la suite de l'inhibition de certaines formes enzymatiques utilisant le même cofacteur. Parmi les formes enzymatiques inhibées, se trouve au moins celle qui métabolise le 12,13-dihydrodiol en 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol et à laquelle correspond approximativement une constante d'inhibition égale à 0.3×10^{-4} M (Fig. V.8).

Les comportements cinétiques observés à faibles concentrations de norharman (Fig. V.7 et V.8) paraissent difficiles à interpréter. Il est possible, toutefois, qu'ils soient dus à la présence au sein des microsomes d'une activité catalytique qui est plus sensible à la β-carboline (totalement inhibée au-delà de 2.10^{-4} M de norharman) et qui transforme le dihydrodiol en des composés non éluables en HPLC. De telles transformations ont été en effet, postulées dans le chapitre précédent pour interpréter l'aspect quantitatif du métabolisme des dihydrodiols (voir Chapitre IV).

Cette voie serait donc en compétition avec celle dont la vitesse de réaction est étudiée (transformation du 12,13-dihydrodiol en 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol) et pourrait ainsi engendrer des modifications importantes de la concentration en substrat pendant la durée de l'incubation (10 minutes). De telles modifications peuvent aboutir à des mesures erronées de la vitesse de formation du 3-hydroxy-12,13-dihydrodiol.

L'inhibition de cette voie catalytique et l'augmentation de la concentration initiale en substrat, doivent dans ces conditions concourir à des mesures de vitesse plus justes (Fig. V.8).

CHAPITRE VI

Modèle enzymatique et effets biologiques (formes métaboliques ultimes)

I - INTRODUCTION

La nature et la séquence des réactions des monooxygénases cytochromiques, conduisant à l'oxydation d'un hydrocarbure aromatique polycyclique ne sont pas totalement élucidées.

Nous savons toutefois, que la première étape du cycle catalytique correspond à la fixation du substrat sur l'enzyme, qui subit alors des modifications conformationnelles aboutissant à une complexation pentacoordonnée du fer de l'hème. Celui-ci se caractérise alors par un état de spin élevé et par une bande d'absorption de Soret située à 390 nm. La fixation du substrat induit aussi des modifications du potentiel redox, qui passe de -300 mV (enzyme native) à -200 mV environ, rendant ainsi l'enzyme beaucoup plus réductible par la NADPH-cytochrome P-450 réductase.

La nature de cette interaction cytochrome-substrat demeure cependant mal connue. Un modèle, assez spéculatif, a été proposé par Estabrook faisant intervenir les systèmes électroniques appartenant à la fois au substrat aromatique (benzo(a)pyrène) et à un des cycles pyrroliques de l'hème. Il existerait, dans ces conditions, une orientation unique du benzo(a)pyrène avec une interaction maximale - et telle que le fer, site oxygénant de l'hème, soit situé à une distance permettant l'oxydation des sites 3,4,5,7,8,9 et 10 de la molécule (162).

En combinant les données expérimentales sur les principales étapes enzymatiques subies par le DBF, avec les particularités métaboliques décrites dans les chapitres précédents, il devient possible de proposer un modèle plus précis de fixation du DBF sur le cytochrome P-450. Ce sera présenté dans le paragraphe qui suit.

Du point de vue biologique, il est important de rappeler que le rôle essentiel des monooxygénases hémoprotéiques est d'éliminer des composés endogènes ou exogènes, qui sont en général assez fortement hydrophobes et qui constituent, donc, des substances très toxiques pour la cellule.

L'activation métabolique du DBF, aboutissant à la (ou les) forme(s) ultime(s) responsable(s) des processus de la cancérisation, ne doit représenter qu'une partie infime de la totalité des voies métaboliques du DBF et de ses dérivés.

L'identification de la (ou les) voie(s) métabolique(s) aboutissant au(x)

dérivé(s) ultime(s), requiert des test biologiques systématiques, in vitro (fixation covalente sur le DNA, mutagénèses bactériennes ...) et in vivo (tests de cancérisation effectués sur des animaux de laboratoire), utilisant les différents métabolites isolés.

Dans le paragraphe 3, nous essayerons cependant de corréler les caractéristiques du métabolisme du DBF aux effets biologiques obtenus en testant certains métabolites suspectés d'intervenir dans les étapes d'activation de ce puissant cancérogène.

II - Modèle d'interaction : cytochrome P-450-DBF

A) Particularités des voies métaboliques du DBF

Les principales voies métaboliques étudiées dans les Chapitres II et III sont représentées sur la Fig. VI.1. Rappelons que les incubations correspondantes étaient effectuées en présence de microsomes hépatiques de rats préalablement traités au 3-méthylcholanthrène.

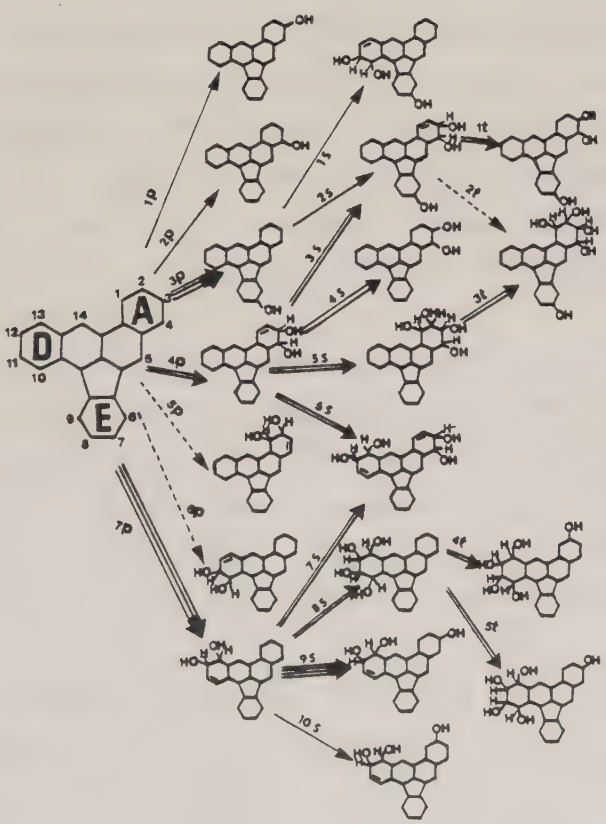


FIG. VI-1. – Principales voies métaboliques du DBF (microsomes hépatiques de rat).

Les enseignements que nous pouvons tirer de ce diagramme métabolique sont nombreux :

- Toutes les structures métaboliques formées conservent au moins un cycle benzénique intact correspondant à l'un des trois cycles A, D ou E. En d'autres termes, les enzymes microsomales de rats ne seraient pas capables de convertir le DBF en un métabolite correspondant à trois oxydations portant successivement sur les cycles A, D et E.
- Les sites moléculaires ayant subi préférentiellement les oxydations enzymatiques correspondent en majorité aux trois liaisons 3-4, 12-13 et 6-7 (ou le sommet 7) quelle que soit la nature du dérivé métabolisé.
- L'époxydation vicinale du 3,4-dihydrodiol (voie 5S) et celle du 12,13-dihydrodiol (voie 8S) ne constituent pas des réactions prédominantes. Cette évolution métabolique est très caractéristique du DBF, dans la mesure où pour d'autres hydrocarbures polycycliques, les trans-EE-dihydrodiols tels que le 7,8-dihydrodiol-benzo(a)pyrène sont convertis majoritairement en époxydes vicinaux.
- Il est important de constater qu'il suffit de la présence d'un groupement hydroxyle en position 7 de la molécule pour inhiber complètement la formation d'un dihydrodiol au niveau de la liaison 12-13. Symmétriquement, le 12,13-dihydrodiol ne conduit pas métaboliquement au dérivé hydroxylé en position 7. Nous constatons que d'une façon générale, l'hydroxylation en 7 ne se produit que si le produit parent dispose d'un cycle benzénique D intact (DBF, 3,4-dihydrodiol, 1,2,3,4-tétrol). Par contre, la destruction partielle ou totale du cycle benzénique D (12,13-dihydrodiol et 10,11,12,13-tétrol) empêche la formation d'un métabolite correspondant à l'hydroxylation du carbone 7.

Nous pouvons signaler une dernière particularité métabolique qui ne figure pas sur le Schéma VI.1, mais est la conséquence des études comparatives développées dans le Chapitre IV ; les liaisons 12-13 et 6-7 (ou le sommet 7) sont similairement accessibles à l'action des monooxygénases ; en d'autres termes, les deux métabolites correspondant à l'oxydation de ces deux liaisons semblent se former avec des efficacités comparables, quelque soit le système enzymatique utilisé.

Un modèle d'interaction cytochrome P-450-DBF pourrait être formulé à partir de l'ensemble de ces caractéristiques. Néanmoins, nous ne devons pas perdre de vue que les voies métaboliques représentées sur la Fig. VI.1 ne résultent pas, comme nous l'avons signalé dans les Chapitres VI et V, de l'activité d'une seule enzyme. Bien que le modèle envisagé puisse être généralisé à toutes les formes enzymatiques impliquées dans l'ensemble des processus métaboliques du DBF, il est toutefois souhaitable de ne tenir compte que de l'activité d'une seule enzyme.

B) Voies métaboliques du DBF en présence de 0,9 mM de norharman

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre précédent, le norharman semble inhiber spécifiquement certaines formes de cytochromes P-450 impliquées dans le métabolisme de dérivés relativement polaires. L'activité enzymatique non altérée par le norharman pourrait être associée à une enzyme plus spécialisée dans la métabolisation de composés hydrophobes. Dans l'état actuel de nos connaissances, cette forme enzymatique serait vraisemblablement $P\text{-}450_c$, c'est-à-dire l'enzyme inductible par le 3-méthylcholanthrène (microsomes hépatiques de rats).

Nous avons représenté sur la Fig. VI.2, les voies métaboliques du DBF en présence de 0,9 mM de norharman ; toutes les structures moléculaires établies seraient donc issues de l'activité d'une seule enzyme. Il est important de noter que les 4 particularités 1 , 2 , 3 et 4 mentionnées dans le paragraphe précédent s'observent également sur la Fig. VI.2.

L'effet du norharman correspond donc à une simplification métabolique permettant d'aborder plus facilement l'établissement d'un modèle d'interaction enzyme-DBF.

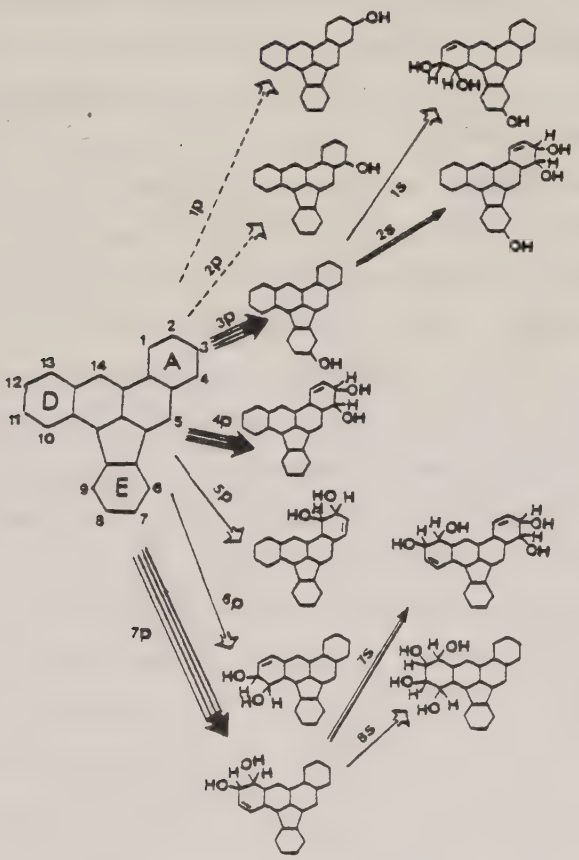


FIG. VI-2. — Principales voies métaboliques du DBF en présence de 0,9 mM de norharman (microsomes hépatiques de rat).

C) Modèle

La forme géométrique du DBF, caractérisée par la présence de trois cycles benzéniques latéraux équidistants A, D et E se distingue de celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques dont le métabolisme a été étudiée ces dernières années (benzo(a)pyrène, benz(a)anthracène, chrysène...). Ceux-ci ne possèdent généralement que deux cycles aromatiques latéraux, séparés par une distance approximativement égale à celle séparant deux des trois cycles benzéniques du DBF.

Il existe une analogie entre le métabolisme primaire du DBF et celui de ces hydrocarbures ; dans les deux cas, on aboutit à l'oxydation enzymatique des noyaux latéraux (trois cycles benzéniques pour le DBF et deux pour les autres hydrocarbures).

Par contre, des différences caractéristiques s'observent au niveau du métabolisme secondaire. L'époxydation vicinale des trans-EE-dihydrodiols est prédominante pour le benzo(a)pyrène par exemple, tandis que pour le DBF, les dihydrodiols subissent préférentiellement une oxydation à distance, c'est-à-dire sur un des deux cycles non porteurs de la fonction dihydrodiol. Toutefois, cette différence n'est qu'apparente ; tous ces hydrocarbures aromatiques polycycliques conservent lors de leur métabolisme, fait d'oxydations successives, un cycle aromatique latéral intact. Du fait de sa forme particulière, le DBF peut subir l'oxydation successive de deux cycles latéraux distincts (voir particularité 1).

Le fait qu'un des cycles benzéniques latéraux demeure intact permet de supposer que ce cycle hydrophobe peut jouer un rôle important dans les processus catalytiques et, plus précisément, dans la fixation du substrat sur l'enzyme. Tous les noyaux latéraux d'une même molécule peuvent, à priori, jouer ce rôle. Cela permet donc au substrat de s'orienter de différentes façons sur l'enzyme.

Notre modèle de l'interaction DBF-cytochrome P-450 repose ainsi sur deux postulats de départ. Le premier est que cette interaction fait intervenir plusieurs orientations possibles du substrat (et non une seule comme dans le modèle d'Estabrook). Le second postulat est que la fixation ou l'ancrage du DBF sur l'enzyme se fait par interaction de nature hydrophobe faisant intervenir un des trois cycles benzéniques et une poche apolaire de la partie protéique du cyt P-450. Sur la Fig. VI.3, nous avons représenté cette poche par une zone hachurée et le site catalytique par une flèche ; cette figure montre que la fixation du cycle benzénique E du DBF permettrait l'oxydation des deux liaisons 3-4 et 12-13, alors que celle du cycle D permettrait l'oxydation de la liaison 6-7. On retrouve ainsi les trois sites préférentiellement oxydés par le cyt P-450 (particularité 2).

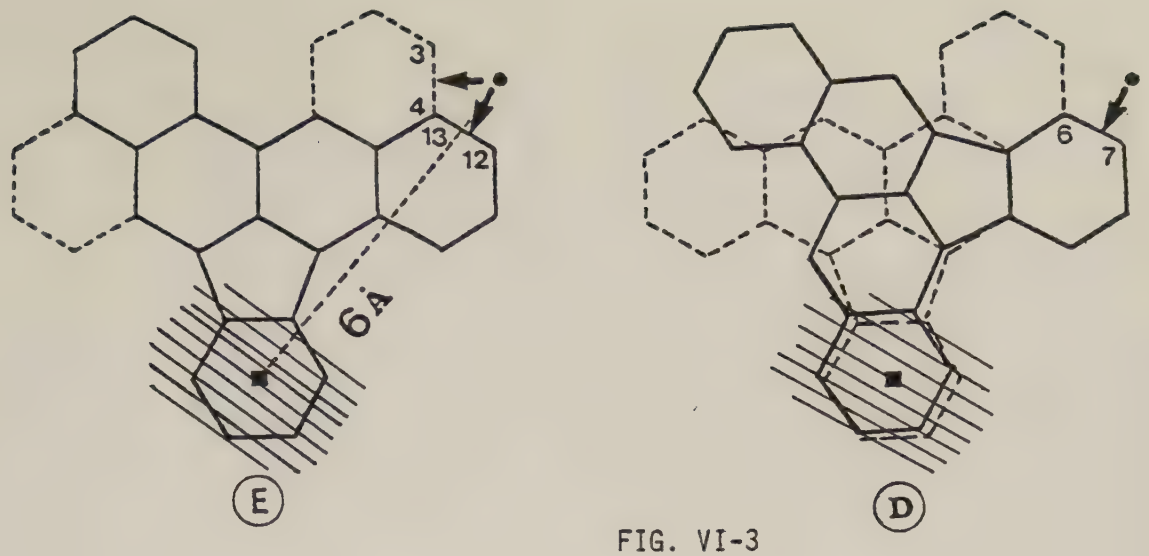


FIG. VI-3

Avec ce modèle, d'autres possibilités théoriques de fixation du DBF sur l'enzyme sont représentées sur la Fig. VI.4. La fixation du cycle A aboutirait, d'une part, à une orientation peu favorable à l'oxydation du site 10-11 et d'autre part, à une deuxième orientation par retournement du substrat ne permettant pas l'oxydation de la liaison 8-9. Enfin, une seconde orientation après fixation du cycle D, est représentée sur la Fig. VI.4. Elle doit permettre l'oxydation du noyau A avec des réactivités faibles ou modérées pour les deux sites 1-2 et 2-3 (et probablement aussi pour le site 3-4). Ce modèle permet ainsi d'interpréter tous les aspects qualitatifs et quantitatifs du métabolisme primaire du DBF.

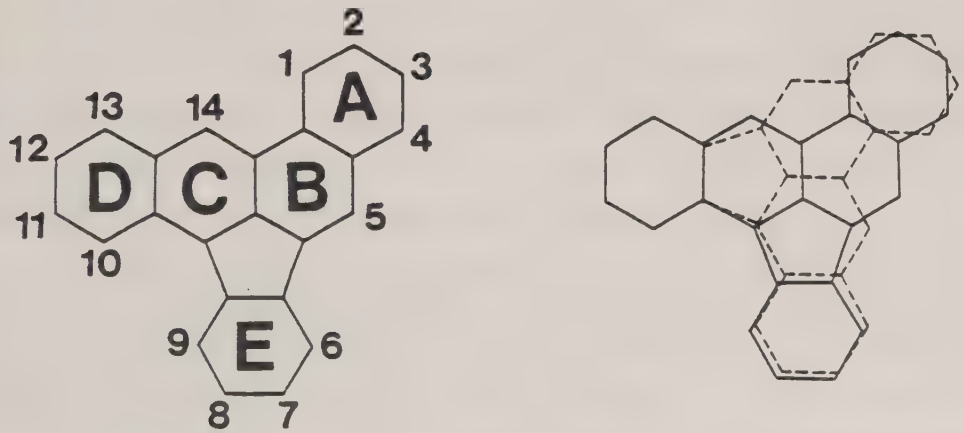


FIG. VI-5

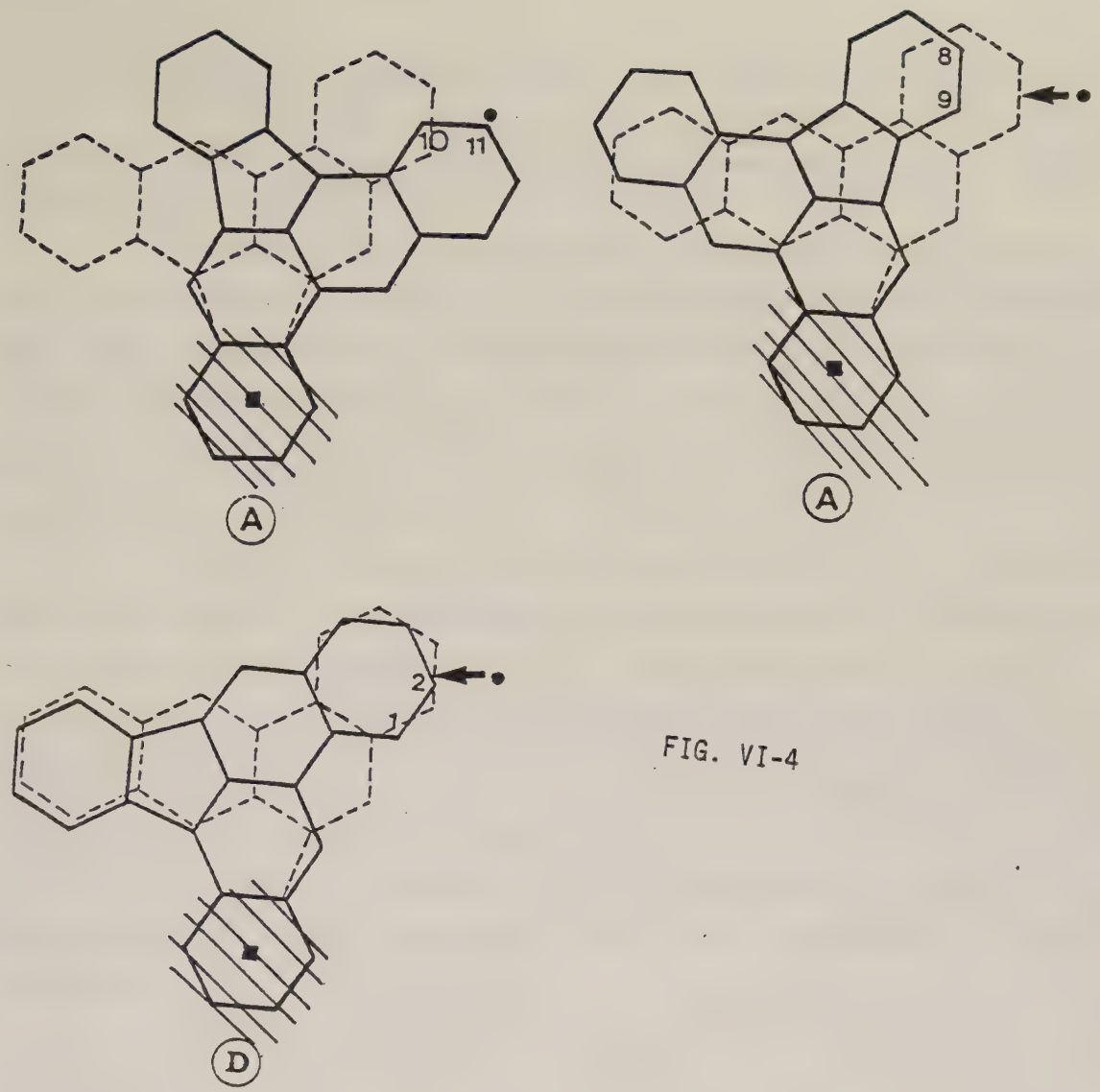


FIG. VI-4

L'hydroxylation du cycle E en position 7 doit entraîner la disparition de l'interaction hydrophobe entre ce cycle et la poche apolaire de l'enzyme ; cela doit aboutir à une inhibition totale de la formation d'un métabolite résultant de l'oxydation de la liaison 12-13. Simultanément, nous devons nous attendre à une forte inhibition de la formation du dihydrodiol de la liaison 3-4 (l'inhibition ne doit pas être totale puisque la fixation du cycle D (Fig. VI.4) doit permettre l'époxydation avec une efficacité faible de la liaison 3-4).

La substitution de groupements polaires sur le cycle D (12,13-dihydrodiol) doit inhiber le métabolisme de la liaison 6-7 de la molécule (Fig. VI.3). Toutes ces prédictions théoriques issues du modèle correspondent parfaitement aux résultats expérimentaux obtenus pour le métabolisme secondaire du DBF (Fig. VI.2).

D'après ce modèle, il apparaît que les deux orientations permettant l'oxydation des sites 12-13 et 6-7 (Fig. VI.3) sont très comparables. La Fig. VI.5 montre que, du point de vue stérique, elles sont quasiment identiques. Les vitesses

de formation des deux métabolites associés à ces deux sites doivent donc être très voisines. Cette prédiction théorique trouve également une confirmation expérimentale dans les études métaboliques comparatives développées dans le Chapitre IV (particularité 5).

Ce modèle permet aussi d'interpréter aisément les différences entre le métabolisme secondaire du DBF et celui des autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (particularité 3) ; les dihydrodiols qui dérivent de ces derniers (3,4-dihydrodiol-benzo(a)anthracène, 7,8-dihydrodiol-benzo(a)pyrène...) ne possèdent qu'un seul cycle hydrophobe latéral. Sa fixation préférentielle doit orienter le métabolisme vers l'oxydation du cycle portant déjà le groupement fonctionnel, c'est-à-dire vers l'époxydation vicinale.

La Fig. VI.3 montre que la distance entre le centre actif du cytochrome P-450 et la poche hydrophobe protéique spécifique de la fixation d'un cycle latéral doit être de l'ordre de 6 Å. Elle convient parfaitement à la fixation du DBF et d'un très grand nombre d'hydrocarbures cancérogènes (benzo(a)pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène...) mais elle ne peut expliquer le métabolisme de petites molécules (phénanthrène, naphtalène, toluène, benzène...). Plusieurs facteurs peuvent interpréter cette situation :

- la fixation du substrat sur le site hydrophobe ne doit pas être indispensable à l'activité enzymatique, surtout pour les substrats de petites dimensions.
- un modèle ne doit s'appliquer qu'à une seule forme enzymatique. Dans notre cas, il s'agit de l'enzyme non inhibée par le norharman, qui est vraisemblablement $P\text{-}450_c$. Les petites molécules telles que le benzène, toluène... ne sont pas forcément métabolisées par cette enzyme. D'autres formes présentes dans les microsomes peuvent intervenir dans ce métabolisme avec des modalités différentes de fixation du substrat.
- certains cytochromes P-450 peuvent présenter une activité peroxydative, c'est-à-dire qu'ils catalysent des hydroxylations en faisant intervenir des intermédiaires peroxydes. Ces réactions sont mal connues. Elles pourraient cependant s'ajouter aux réactions oxydatives des cyt P-450 et rendraient plus difficile, l'interprétation de certains résultats.

III - EFFETS BIOLOGIQUES ET FORMES METABOLIQUES ULTIMES

Les métabolites susceptibles de subir une époxydation vicinale selon la théorie de la région baie sont le 12,13-dihydrodiol et le 3,4-dihydrodiol. A ceux-ci s'ajouteraient le 7-hydroxy-DBF et son dérivé le 7-hydroxy-3,4-dihydrodiol.

Les dihydrodiols-époxydes vicinaux issus de ces trois métabolites agiraient au niveau des macromolécules cellulaires par l'intermédiaire d'ions carboniums fortement électrophiles. Les calculs théoriques développés dans un récent article (163) montrent qu'un tel carbocation est plus facilement obtenu à partir du 1,2-époxy-3,4-dihydrodiol que du 10,11-époxy-12,13-dihydrodiol. On devrait donc s'attendre à ce que le 3,4-dihydrodiol soit biologiquement plus réactif que le 12,13-dihydrodiol.

Des études quantitatives de fixation sur les acides nucléiques effectuées in vitro en présence de microsomes hépatiques de rats, ont montré cependant que c'est le 12,13-dihydrodiol qui manifeste la plus grande réactivité vis-à-vis de ces macromolécules sur lesquelles il se fixe avec un rendement respectivement 6 fois et 3 fois plus grand que celui du DBF et du 3,4-dihydrodiol (O. Périn et coll.). Ce résultat est confirmé par la fixation non enzymatique des deux époxy-dihydrodiols synthétisés chimiquement (O. Périn et coll.). Par ailleurs, le test de mutagénèse d'Ames effectué sur S. typhimurium en présence des enzymes microsomales de rats (Malaveille et coll.) a permis de montrer que le 12,13-dihydrodiol est environ 10 fois plus mutagène que le 3,4-dihydrodiol, lequel ne présente qu'une activité comparable à celle du DBF. Il est important de noter qu'au cours de ces tests biologiques, le 7-hydroxy-DBF s'est avéré complètement dépourvu de tout pouvoir mutagène.

Toutes ces expériences semblent ainsi attribuer directement ou indirectement, au 10,11-époxy-12,13-dihydrodiol une forte réactivité chimique, en contradiction avec les calculs théoriques mentionnés ci-dessus.

Bien évidemment, des considérations stéréochimiques peuvent modifier les prévisions théoriques. En effet, l'époxydation enzymatique vicinale de chacun des dihydrodiols peut théoriquement aboutir à deux stéréoisomères de réactivité chimique différente. La configuration des deux tétrols formés (le 1,2,3,4-tétrol et le 10,11,12,13-tétrol) n'ayant pas été élucidée, il n'est pas possible d'identifier par ce biais la conformation stéréoisomère des deux époxy-dihydrodiols.

Compte tenu de ces résultats biologiques obtenus in vitro, doit-on considérer que la forme ultime, c'est-à-dire le métabolite impliqué dans la première étape de la cancérisation est le 10,11-époxy-12,13-dihydrodiol ?

Pour répondre à une telle question, il est nécessaire de tester in vivo le pouvoir cancérogène de chacun des époxy-dihydrodiols ou du moins de leur précurseurs métaboliques, les dihydrodiols.

L'expérience d'initiation avec les deux dihydrodiols et avec le 7-hydroxy-DBF obtenus par biosynthèse est actuellement en voie d'achèvement. Le dérivé hydroxylé est totalement inactif. Les dihydrodiols ont donné pratiquement le même nombre de tumeurs avec un léger avantage pour le 3,4-dihydrodiol (ces

expériences ont été effectuées sur des souris).

Les divergences dans les résultats de mutagénicité et le pouvoir d'initiation cancérogène avec les deux dihydrodiols peuvent peut être s'expliquer par les différences de métabolisation secondaire entre la souris et le rat (Chapitre IV). Il est donc nécessaire, pour confirmer la forte activité biologique du 12,13-dihydrodiol, d'effectuer les tests de cancérogénèse sur des rats qui disposent d'un équipement enzymatique capable de transformer le dihydrodiol en époxyde vicinal avec une efficacité plus grande que celle obtenue chez la souris (voir Chapitre IV).

L'analyse du DNA après l'incubation microsomale en présence du DBF tritié, montre la présence de nombreux pics chromatographiques d'adduits dont trois majoritaires (Périn et coll.). Il est donc possible que le DBF soit capable d'engendrer plusieurs modèles de métabolites ultimes. Une telle particularité résulterait de sa structure caractéristique avec les trois cycles latéraux facilement accessibles à l'action des monooxygénases.

REFERENCES

1 Wynder, E.L. (1977). Nature 268, 284.

2 (1975). Ann. Rev.Biochem. 44, 79-121.

3 In "Cancer Incidence in Five Continents", volume 2 (Doll et al.) (1970).

4 Cavins, J. (1975). Scientific American, 64-68.

5 Redmond, D.E. Jr. New Engl. J. Med. (1970), 282, 18-23.

6 Potter, M. (1963). Natl. Cancer Inst. Monogr. 10, 1-13.

7 Pott, P. (1775). In "The Chirurgical Works on Percivall Pott". Printed for Hawes, W., Clarke and Collins in Pater-Noster Row, London, p. 734.

8 Sims, P., Grover, P.L. (1976). Med. Biol. Environ. 4, 315.

9 Ayengar, P.K., Hayaishi, O., Nakajima, M. and Tomida, I. (1959). Biochim. Biophys. Acta 33, 111-119.

10 Kumaki, K., Jensen, N.M., Shire, J.G.M. and Nebert, D.W. (1977). J. Biol. Chem. 252, 157-165.

11 Owens, I.S. (1977). J. Biol. Chem. 252, 2827-2833.

12 Nebert, D.W., Jensen, N.M., Perry, J.W. and Oka, T. (1980). J. Biol. Chem. 255, 6836-6842.

13 Carlstedt-Duke, J., Elfström, G., Snochowski, M., Högberg, B. and Gustafsson, J.A. (1978). Toxicol. Lett. 2, 365-373.

14 Poland, A.P., Glover, E. and Kende, A.S. (1976). J. Biol. Chem. 252, 4936-4946.

15 Okey, A.B., Bondy, G.P., Mason, M.E., Kahl, G.F., Eisen, H.J., Guenthner, T.M. and Nerbert, D.W. (1979). J. Biol. Chem. 254, 11636-11648.

16 Mirva, G.T., West, S.B. and Lu, A.Y.H. (1978). J. Biol. Chem. 253, 1921-1929.

17 Butlin, H.T. (1892). Brit. Med. J. 2, 1-6.

18 Von Volkmann, R. (1875). Über Theer. und Russkrebs. Klin. Wochenschr. 11, 218.

19 Yamagiwa, K., Ichikawa, K. (1918). J. Cancer Res. 3, 1-29.

20 Kennaway, E.L. (1930). Biochem. J. 24, 497.

21 Cook, J.W., Hewett, C.L. and Hieger, I. (1933). J. Chem. Soc., 396.

22 Food Cosmet. Toxicol. 10, 100-102 (1972).

23 Tomatis, O., Agthe, C., Bartsch, H., Huff, J., Montesano, R., Saracc, R., Walker, A. and Wilbourn, J. (1978). Cancer Res. 38, 877-885.

24 Poindexter, E.H. Jr. and Carpenter, R.D. (1962). Phytochemistry 1, 215.

25 Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., Sugimura, T., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Mizusaki, S. and Matsumoto, T. (1977). Proc. Jpn. Acad. 53, 95-98.

26 Gelboin, H.V., Ts'o, P.O.P. (1978). In "Polycyclic Hydrocarbons and Cancer", vol. 2, Academic Press New York, San Francisco, London, p. 115.

27 Umezawa, K., Shirai, A., Matsushima, T. and Sugimura, T. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 928-930.

28 Nagao, M., Yahagi, T. and Sugimura, T. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 373.

29 Fujino, T., Fujiki, H., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y. and Sugimura, T. (1978). Mutation Res. 58, 151-158.

30 Fujino, T., Matsuyama, A., Nagao, M. and Sugimura, T. (1980). Chem. Biol. Interations 32, 1-12.

31 Périn-Roussel, O., Ekert, B. and Zajdela, F. (1981). Chem. Biol. Int. 37, 109-122.

32 Vaz, A.D., Fiorica, V.M. and Griffin, M.J. (1981). Biochem. Pharmacol. 30, 651-656.

33 Luu-The, V., Cumps, J., Dumont, P. (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 776-781.

34 Griffin, B.W. and Peterson, J.A. (1972). Biochemistry 11, 4740-47746.

35 Lavit-Lamy, D. and Buu-Hoi, N.P. (1966). Chem. Commun., 92-93.

36 Lavit-Lamy, D. and Buu-Hoï, N.P. (1966). Bull. Soc. Chim. Fr., 2613-2619.

37 Campbell, N. and Marks, A. (1951). J. Chem. Soc. (London), 2941-2943.

38 Fieser, F.L. and Hershberg, E.B. (1937). J. Am. Chem. Soc. 59, 2502-2509.

39 Garner, R.C., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1972). Cancer Res. 32, 2058-2066.

40 Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2281-2285.

41 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265-275.

42 Daudel, O. and Daudel, R. (1966). In "Chemical Carcinogenesis and Molecular Biology". Interscience Publishers, New York.

43 Committee on Biologic Effects of Atmospheric Polluants (1972) : Particulate Polycyclic Organic Matter. National Academy of Sciences, Washington, D.C.

44 Grover, P.L. and Sims, P. (1969). Biochem. J. 110, 159-160.

45 Miller, E.C. (1978). Cancer Res. 38, 1479-1496.

46 Heidelberger, C. (1975). Chemical Carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem. 44, 79-121.

47 Boyland, E. (1950). Biochem. Soc. Symp. 5, 40-54.

48 Gelboin, H.V. (1969). In "The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. Physico-Chemical Mechanisms of Carcinogenesis". E.D. Bergman et B. Pullman, Eds. Jerusalem, Israel Academy of Sciences and Humanities, Vol. 1, pp. 175-182.

49 Grover, P.L., Hewer, A., Sims, P. (1971). FEBS Lett. 18, 76-80.

50 Kuroki, T., Huberman, E., Marquardt, H. et al. (1971/72). Chem. Biol. Interactions 4, 389-397.

51 Pullman, A. et Pullman, B. (1955). "Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire". Masson, Paris.

52 Baird, W.M., Dipple, A., Grover, P.L. et al. (1973). Cancer Res. 33, 2386-2392.

53 Borgen, A., Darvey, H., Castagnoli, N. et al. (1973). J. Med. Chem. 16, 502-506.

54 Sims, P., Grover, P.L., Sweisland, A. et al. (1974). Nature 252, 326-328.

55 Brookes, P., Newbold, R.F. and Osborne, M.R. (1979). In "Environmental Carcinogenesis : Occurrence, Risk Evaluation and Mechanisms". (P. Emmelot and E. Kriek, Eds.), Amsterdam, Elsevier/North-Holland, p. 123-142.

56 Huberman, E., Sachs, L., Yang, S.K. and Gelboin, H.V. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 607-611.

57 Jerina, D.M., Yagi, H., Hernandez, O. et al. (1976). In "Carcinogenesis - A Comprehensive Survey, vol. 1 : Polynuclear Aromatic Hydrocarbons : Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis" (R. Freudenthal and P.W. Jones, Eds.), Raven Press, New York, p. 91-113.

58 Levin, W., Wood, A.D., Chang, R.L. et al. (1977). Cancer Res. 37, 2721-2725.

59 Weinstein, I.B., Jeffrey, A.M., Jennette, K.W. et al. (1976). Science 193, 592-595.

60 Jerina, D.M., Lehr, R., Schaefer-Ridder, M. et al. (1977). In "Origins of Human Cancer" (H.H. Hiatt, J.D. Watson and J.A. Winsten, Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 639-658.

61 Cavalieri, E., Roth, R. and Rogan, E.G. (1976). In "Carcinogenesis, vol. 1 : Polynuclear Aromatic Hydrocarbons : Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis" (R. Freudenthal and P.W. Jones, Eds.), Raven Press, New York, p. 181-190.

62 Flesher, J.A. and Sydnor, K.L. (1973). Int. J. Cancer 11, 433-438.

63 Sloane, N.H., Chen, H., Dirvan, B. et al. (1976). In"Carcinogenesis, vol. 1 : Polynuclear Aromatic Hydrocarbons : Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis" (R. Freudenthal and P.W. Jones, Eds.), Raven Press, New York, p. 171-180.

64 Ziegler, D.M. and Mitchell, C.H. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 150, 116-125.

65 Cooper, D.Y., Levine, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. and Estabrook, R.W. (1965). Science 400-402.

66 Lu, A.Y.H., Kuntzman, R., West, S., Jacobson, M. and Conney, A.H. (1972). J. Biol. Chem. 247, 1727-1734.

67 Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I. and Hansson, A. (1979). Acta Biol. Med. Ger. 38, 379-388.

68 Campbell, T.C. and Hayes, J.R. (1974). Pharmacol. Rev. 26, 171-197.

69 Ullrich, V., Roots, I., Hildebrandt, A., Estabrook, R.W. and Conney, A.H. (1977). In "Microsomes and Drug Oxidations", Pergamon Press, New York.

70 Weisburger, J.H. and Williams, G.M. (1975). In "Cancer : A Comprehensive Treatise. 1. Etiology : Chemical and Physical Carcinogenesis (F.F. Becker, Ed.), Plenum Press, New York, p. 185-234.

71 Lu, A.Y.H. and West, S.B. (1978). Pharmacol. Ther. A. 2, 337-358.

72 Huang, M.T., West, S.B. and Lu, A.Y.H. (1976). J. Biol. Chem. 251, 4659-4665.

73 Johnson, E.F., Levitt, D.S., Muller-Eberhard, U. and Thorgeirsson, S.S. (1980). Cancer Res. 40, 4456-4459.

74 Wiebel, F.J., Selkirk, J.K., Gelboin, H.V., Hangen, D.A., Van der Hoeven, T.A. and Coon, M.J. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3917-3920.

75 Hangen, D.A., Van der Hoeven, T.A. and Coon, M.J. (1975). J. Biol. Chem. 250, 2157-2163.

76 Hangen, D.A. and Coon, M.J. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7929-7939.

77 Hashimoto, C. and Imai, Y. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 821-827.

78 Koop, D.R. and Coon, M.J. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1075-1081.

79 Nordqvist, M., Thakker, D.R., Yagi, H., Lehr, R.E., Wood, A.W., Levin, W., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1980). In "Molecular Basis of Environmental Toxicity". (R.S. Bhatanagar, Ed.), Ann Harbor Science Publishers Inc., Michigan, p. 329-357.

80 Thakker, D.R., Yagi, H., Akagi, H., Koreeda, M., Lu, A.Y.H., Levin, W., Wood, A.W., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1977). Chem. Biol. Interactions 16, 281-300.

81 Yang, S.K., Mc Court, D.W., Roller, P.P. and Gelboin, H.V. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2574-2598.

82 Nordqvist, M., Thakker, D.R., Vyas, K.P., Yagi, H., Levin, W., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1981). Mol. Pharmacol. (sous presse).

83 Wood, A.W., Levin, W., Thakker, D.R., Yagi, H., Chang, R.L., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Dansette, P.M., Whittaker, N., Turujman, S., Lehr, R.E., Kumar, S., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1979). J. Biol. Chem. 254, 4408-4415.

84 Thakker, D.R., Yagi, H., Lehr, R.E., Levin, W., Buening, M., Lu, A.Y.H., Chang, R.L., Wood, A.W., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1978). Mol. Pharmacol. 14, 502-513.

85 Yang, S.K. and Chou, M.W. (1980). Carcinogenesis 1, 803-806.

86 Chou, M.W., Fu, P.P. and Yang, S.K. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4270-4273.

87 Vyas, K.P., Yagi, H., Levin, W., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 961-969.

88 Vogel, K., Bentley, P., Platt, K.L. and Oesch, F. (1980). J. Biol. Chem. 255, 9621-9625.

89 Booth, J. and Sims, P. (1976). Biochem. Pharmacol. 25, 979-980.

90 Jerina, D.M., Ziffer, H. and Daly, J.W. (1970). J. Am. Chem. Soc. 92, 1056-1061.

91 Glatt, H.R., Vogel, K., Bentley, P. and Oesch, F. (1979). Nature 277, 319-320.

92 Lang, M.A. and Nebert, D.W. (1981). J. Biol. Chem. 256, 12058-12067.

93 Negishi, M. and Nebert, D.W. (1979). J. Biol. Chem. 254, 11015-11023.

94 Negishi, M., Jensen, N.M., Garcia, G.S. and Nebert, D.W. (1981). Eur. J. Biochem. 115, 585-594.

95 Poland, A.P., Glover, E., Robinson, J.R. and Nebert, D.W. (1974). J. Biol. Chem. 249, 5599-5606

96 Atlas, S.A., Boobis, A.R., Felton, J.S., Thorgevisson, S.S. and Nebert, D.W. (1977). J. Biol. Chem. 252, 4712-4721.

97 Johnson, E.F. (1980). J. Biol. Chem. 255, 304-309.

98 Thorgeirsson, S.S. and Nebert, D.W. (1977). Adv. Cancer Res. 25, 149-193.

99 Nebert, D.W., Atlas, S.A., Guenthner, T.M. and Kouri, R.E. (1978). In "Polycyclic Hydrocarbons and Cancer : Chemistry, Molecular Biology and Environment" (P.O.P. Ts'o and H.V. Gelboin, Eds.), Academic Press, New York, p. 345-390.

100 Guengerich, F.P. (1979). Pharmacol. Ther. 6, 99-121.

101 Goujon, F.M., Nebert, D.W. and Gielen, J.E. (1972). Mol. Pharmacol. 8, 667-680.

102 Nebert, D.W. (1970). J. Biol. Chem. 245, 519-527.

103 Imai, Y. and Siekevitz, P. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 144, 143-159.

104 Tukey, R.H. and Nebert, D.W. (1981). Fed. Proc. 40, 1650.

105 Nebert, D.W., Eisen, H.J., Negishi, M., Lang, M.A., Hjelmeland, L.M. and Okey, A.B. (1981). Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 431-462.

106 Tukey, R.H., Nebert, D.W. and Negishi, M. (1981). J. Biol. Chem. 256, 6969-6974.

107 Nebert, D.W. and Jensen, N.M. (1979). CRC Crit. Rev. Biochem. 6, 401-437.

108 Nebert, D.W. (1980). Arch. Toxicol. Suppl. 3, 195-207.

109 Ryan, D.E., Thomas, P.E., Korzeniowski, D. and Levin, W. (1979). J. Biol. Chem. 254, 1365-1374.

110 Kotake, A.N. and Funae, Y. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6473-6475.

111 Thomas, P.E., Korzeniowski, D., Ryan, D. and Levin, W. (1979). Arch. Biochem. Biophys. 192, 524-532.

112 IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, vol. 3, p. 69-90, Lyon (France) : International Agency for Research on Cancer (1973).

113 Lacassagne, A., Buu-Hoï, N.P., Zajdela, F. and Lavit-Lamy, D. (1963). C.R. Acad. Sci. 256, 2728-2730.

114 O'Donnell, C. (1981). Ir. J. Environ. Sci. 1, 78-8.

115 Snook, M.E., Severson, R.S., Arrendale, R.F., Higman, H.C. and Chortyk, O.T. (1977). Beitr. Tabakforsch. 9, 79-101.

116 Streitwieser, A., Jr. (1961). In "Molecular Orbital Theory for Organic Chemists", Wiley, New York.

117 Smith, J.A., Berger, G.D., Seybold, P.G. and Serve, M.P. (1978). Cancer Res. 38, 2968-2977.

118 Tierney, B., Hewer, A., Mac Nicoll, A.D., Gervasi, P.G., Rattle, H., Walsh, C., Grover, P.L. and Sims, P. (1978). Chemical Biol. Interactions 23, 243-257.

119 Van der Donckt, E. (1970). Prog. React. Kinet. 5, 274-298.

120 Wislocki, P.G., Fiorentini, K.M., Fu, P.P., Chou, M.W., Yang, S.K. and Lu, A.Y.H. (1981). Carcinogenesis 2, 507-509.

121 Wislocki, P.G., Juliana, M.M., Mac Donald, J.S., Chou, M.W., Yang, S.K. and Lu, A.Y.H. (1981). Carcinogenesis 2, 511-514.

122 Hecht, S.S., Amin, S., Rivenson, A. and Hoffmann, D. (1979). Cancer Lett. 8, 65-70.

123 Ingelman-Sundberg, M., Glaumann, H. and Johansson, I. (1980). In "Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis" (M.J. Coon et al., Eds.), Academic Press, New York.

124 Estabrook, R.W. and Werringloer, J. (1977). In "Drug Metabolism Concepts" (D.M. Jerina, Ed.), ACS Symposium Series, Vol. 44, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 1-26.

125 White, R.E. and Coon, M.J. (1980). Ann. Rev. Biochem. 49, 315-356.

126 Coon, M.J. and White, R.E. (1979). In "Dioxygen Binding and Activation by Metal Centers" (T.G. Spiro, Ed.), John Wiley and Sons, New York.

127 Gigon, P.L., Gram, T.E. and Gillette, J.R. (1969). Mol. Pharmacol. 5, 109-122.

128 Peterson, J.A., Ebel, R.E., O'Keeffe, D.H., Matsubara, T. and Estabrook, R.W. (1976). J. Biol. Chem. 251, 4010-4016.

129 Imai, Y., Sato, R. and Iyanagi, T. (1977). J. Biochem. (Tokyo) 82, 1237-1246.

130 Iyanagi, T., Anan, F.K., Imai, Y. and Mason, H.S. (1978). Biochemistry 17, 2224-2230.

131 Enoch, H.G. and Strittmatter, P. (1979). J. Biol. Chem. 254, 8976-8981.

132 Welton, A.F. and Aust, S.D. (1975). Biochem. Pharmacol. 24, 1641-1644.

133 Coon, M.J., Vermilion, J.L., Vatsis, K.P., French, J.S., Dean, W.L. and Haugen, D.A. (1977). In "Drug Metabolism Concepts" (D.M. Jerina, Eds.), ACS Symposium Series, Vol. 44, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 46-71.

134 Matsubara, T.; Baron, J., Peterson, L.L. and Peterson, J.A. (1976). Arch. Biochem. Biophys. 172, 463-469.

135 Peterson, J.A., Ebel, R.E., O'Keefe, D.H., Matsubara, T. and Estabrook, R.W. (1976). J. Biol. Chem. 251, 4010-4016.

136 Yang, C.S. and Strickhart, F.S. (1975). J. Biol. Chem. 253, 7968-7972.

137 Miwa, G.T., West, S.B. and Lu, A.Y.H. (1978). J. Biol. Chem. 253, 1921-1929.

138 Miwa, G.T., West, S.B., Huang, M.T. and Lu, A.Y.H. (1979). J. Biol. Chem. 254, 5695-5700.

139 Iyanagi, T. and Mason, H.S. (1973). Biochemistry 12, 2297-2308.

140 Vermilion, J.L. and Coon, M.J. (1974). Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1315-1322.

141 Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O. (1966). Arch. Biochem. Biophys. 117, 660-673.

142 Katagiri, M., Ganguli, B.N. and Gunsalus, I.C. (1968). J. Biol. Chem. 243, 3543-3546.

143 Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. and Coon, M.J. (1981). J. Biol. Chem. 256, 266-277.

144 Estabrook, R.W. and Werringloer, J. (1977). In "Drug Metabolism Concepts" (D.M. Jerina, Ed.), ACS Symposium Series, Vol. 44, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 1-26.

145 Gustafsson, J.A., Rondahl, L. and Bergman, J. (1979). Biochemistry 18, 865-870.

146 Sligar, S.G., Kenney, K.A. and Pearson, D.C. (1980). In "Oxidases and Related Redox Systems" (T.E. King, H.S. Mason and M.E. Morrison, Eds), Pergamon Press, Oxford.

147 Ortiz de Montellano, P.R. and Kunze, K.L. (1980). J. Biol. Chem. 255, 5578-5585.

148 Ortiz de Montellano, P.R., Kunze, K.L. and Mico, B.A. (1981). J. Biol. Chem. 256, 4395-4399.

149 Gurtoo, H.L., Marinello, A.J., Struck, R.F., Paul, B. and Dahms, R.P. (1981). J. Biol. Chem. 256, 11691-11701.

150 De Matteis, F. (1974). Mol. Pharmacol. 10, 849-854.

151 Hunter, A.L. and Robert, R.A. (1975). Biochem. Pharmacol. 24, 2199-2205.

152 Levin, W., Jacobson, M., Sernatinger, E. and Kuntzman, R. (1973). Drug Metab. Disp. 1, 275-284.

153 Anders, M.W. and Gander, J.E. (1979). Life Sci. 25, 1085-1090.

154 Kamataki, T., Kitada, M., Chiba, K., Kitagawa, H., Imai, Y. and Sato, R. (1980). Biochem. Pharmacol. 29, 1141-1147.

155 Tunek, A. and Oesch, F. (1979). Biochem. Pharmacol. 28, 3425-3429.

156 Lu, A.Y.H. and West, S.B. (1978). Pharmacol. Ther., Part A : Chemother. Toxicol. Metab. Inhibitors 2, 337-358.

157 Bridges, J.W., Benford, D. and Parke, D.V. (1980). In "Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis" (Coon, M.J., Conney, A.H., Estabrook, R.W., Gelboin, H.V., Gillette, J.R. and O'Brien, P.J., Eds.), Academic Press, New York, p. 1005-1008.

158 Hildebrandt, A., Leibman, K. and Estabrook, R. (1969). Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 477-485.

159 Wolf, C.R., King, L.J. and Parke, D.V. (1975). Biochem. Soc. Trans. 3, 175.

160 Nastainszyck, W. and Ullrich, V. (1978). Biochem. Pharmacol. 27, 387.

161 Huang, M.T., Chang, R.L., Fortner, J.G. and Conney, A.H. (1981). J. Biol. Chem. 256, 6829-6836.

162 Estabrook, R.W., Martinez-Zedillo, G., Young, R., Peterson, J.A. and Mc Carthy, J. (1975). J. Steroid Biochemistry 6, 419-425.

163 Périn, O., Croisy, M., Mispelter, J., Saguem, S., Chalvet, O., Ekert, B., Fouquet, J., Jacquignon, P., Lhoste, J.M., Muel, B. and Zajdela, F. (1980). Cancer Res. 40, 1742-1749.

164 Levitt, R.C., Legraverend, M., Nebert, D.W. and Pelkonen, O. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 1167-1175.

165 Mac Nicol, A.D., Cooper, C.S., Ribeiro, O., Gervasi, P.G., Hewer, A., Walsh, C., Grover, P.L. and Sims, P. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 490-497.

166 Hewer, A., Cooper, C.S., Ribeiro, O., Pal, K., Grover, P.L. and Sims, P. (1981). Carcinogenesis 2, 1345-1352.